GABI DROCHIOIU
IONEL MANGALAGIU
IOAN DRUȚĂ

BIOCHIMIE GENERALĂ

C
5633

Casa Editorială Demiurg

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Gabi DROCHIOIU
Ionel MANGALAGIU
Ioan DRUȚĂ

BIOCHIMIE GENERALĂ

136571
B.C.U. - IASI

Casa editorială Demiurg
Iaşi, 2002

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lucrare editată în cadrul proiectului CNCSIS cod 109, cu sprijinul financiar al Guvernului României şi al Băncii Mondiale.

Colecţia **Technos, 5**

Colecţia apare sub coordonarea lui Abdelkrim Azzouz.

1. A. Azzouz, *Ingineria proceselor tehnologice*, vol. I.
2. A. Azzouz, *Tehnologie şi utilaj în industria laptelui*, partea I-III
3. A. Azzouz, *Utilaj şi tehnologie în industria laptelui. Îndrumar.*
4. G. Drochioiu, I. Mangalagiu, I. Druţă, *Elemente de teorie şi practică toxicologică*

Referenţi:

Prof. Dr. Doc. Magda PETROVANU
Prof. Dr. Vlad ARTENIE

Consilier editorial: dr. Alexandrina Ioniţă

Aleea Rozelor nr. 34, bl. A 11, sc. B, parter, ap. 2, 6600 - Iaşi
tel. 032/257033
E-mail: iionita@mail.dntis.ro

© Casa Editorială *Demiurg*
Reproducerea în orice formă, inclusiv prin xerocopiere, fără acordul scris al editurii, intră sub incidenţa legii drepturilor de autor.

ISBN: 973-8076-12-6

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuvânt înainte

Lucrarea de față se adresează în mod deosebit studenților chimiști și chimiștilor și se bazează pe cunoștințele de chimie organică acumulate în anii de facultate, fiind o continuare firească a acestora. Noțiunile de biochimie introduse în această carte sunt expuse însă simplu și inteligibil, în așa fel încât ele pot fi înțelese și de către cititorii cu cunoștințe minime de chimie. De aceea, lucrarea poate fi utilă elevilor, studenților și, în general, publicului larg doritor să fie la curent cu principalele achiziții ale biochimiei moderne.

Biochimia reprezintă mai degrabă știința *transformărilor* substanțelor existente în organismele vii și mai puțin o știință a substanțelor individuale. De pildă, biochimia se referă la procesul transformării acidului piruvic în acid lactic, la variațiile concentrațiilor acestor doi compuși, deoarece aceste date sunt importante pentru organismul viu și este mai puțin preocupată de proprietățile lor individuale. Cu toate acestea, în această lucrare nu am neglijat prezentarea însușirilor vitaminelor, a zaharurilor, proteinelor, aminoacizilor, grăsimilor, acizilor nucleici etc. În felul acesta am încercat să netezim calea cititorului de la chimia organică, cu care este familiarizat, la științele viului *Procesele biochimice* se desfășoară continuu atât timp cât se manifestă în celula vie. Acestea se petrec în general pe aceeași direcție cu cele chimice; în

organismul viu ele au loc cu o eficienţă sporită datorită unor mecanisme verificate şi perfecţionate îndelung. Din această cauză, reacţiile care au loc în corpul vieţuitoarelor pot fi înţelese uşor de către chimişti, chiar dacă legile biochimiei sunt specifice şi oarecum diferite de cele ale chimiei. În organism sunt dominante legile viului şi nu cele ale fizicii şi chimiei. În celula vie, este prezentă soluţia moleculară în care se desfăşoară procese chimice obişnuite şi biostructura, purtătoarea însuşirilor de viu, care condiţionează manifestarea specificului biologic. De aceea, am încercat cât ne-a stat în putinţă să sesizăm în cadrul proceselor biochimice descrise acea specificitate ce se poate numi pe bună dreptate "logica viului".

Prezenta lucrare are în vedere numai procesele biochimice fundamentale care, studiate atent, permit studentului să treacă mai departe la înţelegerea fenomenelor complicate care se desfăşoară în organismul viu. Ea se doreşte a fi o punte între frumuseţea şi ineditul reacţiilor din eprubeta chimistului şi perfecţiunea celor din plante şi animal.

Autorii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAP. I. VITAMINE

Vitaminele sunt substanțe organice care, în cantități foarte mici, îndeplinesc în organismul animal sau uman funcții specifice și vitale. Ele sunt de natură exogenă, fiind sintetizate de către plante, nu și de către organismul animal sau cel uman. Lipsa lor din hrană provoacă îmbolnăviri grave, numite *avitaminoze*, care pot conduce chiar la moarte. Simptomele bolii dispar dacă se introduc din nou în hrana animalului substanțele care lipsesc. Numele de vitamine (amine vitale), dat acestor substanțe de Casimir Funk, (1911), datează dintr-o epocă în care structura lor nu era cunoscută; în realitate numai unele dintre vitamine conțin azot, deci pot fi numite amine vitale, vitamine.

Vitaminele se aseamănă cu enzimele și hormonii, care sunt însă de natură endogenă, prin acțiunea lor regulatoare asupra funcțiilor celulelor. Unele vitamine servesc organismului pentru sinteza unor coenzime și anume: vitamina B_1 este o componentă a cocarboxilazei, vitamina B_2 a coenzimelor flavinice, nicotinamida a NAD^+ și a $NADP^+$, vitamina B_6 a codecarboxilazei aminoacizilor, acidul pantotenic al coenzimei A și acidul p-aminobenzoic al acidului folic. Pe scurt, vitamina poate fi definită ca substanță importantă pentru procesele vieții, necesară în cantități foarte reduse, utilă în funcționarea normală a celulelor, dar care nu poate fi sintetizată de către organism, ci trebuie introdusă prin alimentație.

Unele maladii datorate lipsei vitaminelor din hrană se cunosc de mai multe secole. Printre acestea se numără scorbutul, care apare

după o hrănire îndelungată numai cu alimente conservate. De asemenea, este cunoscută de mult acțiunea curativă a sucului de lămâie și a plantelor proaspete asupra scorbutului, boală datorată lipsei vitaminei C. În cercetarea științifică a vitaminelor se provoacă adesea avitaminoze experimentale. Prin hrănirea găinilor cu orez decorticat, apar unele manifestări patologice (polyneuritis gallinarum), care dispar atunci când se hrănesc animalele cu orez necurățat. Simptome similare apar și la om, observate în special în Asia orientală, unde orezul formează alimentul de căpetenie al unei mari părți din populație. Îmbolnăvirea (beri-beri) se datorează lipsei vitaminelor B_1 și B_2, conținute în coaja bobului de orez.

Majoritatea vitaminelor au fost izolate, iar structura lor a fost stabilită prin sinteză.

Provitaminele sunt compuși care diferă într-o oarecare măsură din punct de vedere chimic, îndeplinesc aceleași funcții în organism și a căror carență determină aceleași simptome ca și vitami ele.

Vitaminele au dobândit o importanță considerabilă în medicina modernă, fiind utilizate ca medicamente, nu numai în cazuri de avitaminoze tipice. În acest scop servesc mai ales vitaminele C, A, B_1, D, B_{12}, K și nicotinamida. Acestea se fabrică, în cantități mari, prin sinteză, în afară de vitamina B_{12} care se obține prin procedee fermentative.

Clasificarea vitaminelor se bazează pe criterii de solubilitate (tab.1.1).

Vitaminele hidrosolubile îndeplinesc în general rolul de coenzime. Datorită solubilității lor în apă nu se acumulează în organism în concentrații toxice și se elimină în principal pe cale

renală. Cu excepția vitaminelor C și P, acestea formează complexul B. Aceste vitamine nu sunt înrudite chimic sau asemănătoare ca acțiune fiziologică.

VITAMINE HIDROSOLUBILE

Vitamina B_1

Vitamina B_1 (tiamina, aneurina, vitamina anti beri-beri, vitamina antineuritică) face parte din complexul B, în lipsa căruia apare o maladie numită beri-beri. Afecțiunea se manifestă, între altele, prin tulburări nervoase (polineurită), prin tulburări ale funcției inimii și prin afecțiuni ale pielii. La animale, deficiența tiaminică determină pierderea coordonării musculare ca retracția capului (opistotonus), caracteristic porumbeilor cu hipovitaminoză B_1.

În absența tiaminei apar următoarele simptome: pierderea poftei de mâncare, simptome gastro-intestinale, edeme, tulburări circulatorii, simptome neurologice (somnolență, dureri de cap, nevrită periferică), degenerarea sistemului nervos periferic și paralizia membrelor. Simptome similare pot fi produse și experimental, la animale (găini, porumbei sau șoareci), prin hrănirea lor cu orez decorticat. La animalele tinere, supuse acestui regim, se observă și o încetare a creșterii. Îmbolnăvirea este deci o avitaminoză, iar vitamina B_1, izolată în stare cristalizată din tărâța orezului (Jansen, 1926) și din drojdie (Windaus), o vindecă. Ea se găsește, în foarte mici cantități, în învelișul argintiu al bobului de orez, în legumele verzi, în drojdia de bere, în mușchii și în organele animalelor.

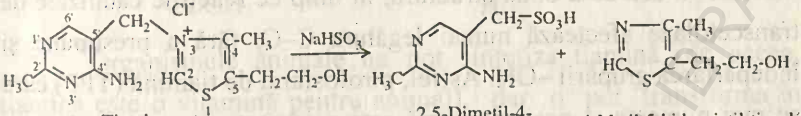
Tabelul 1.1 Principalele vitamine

Vitamina	Denumire	Rol fiziologic principal
	1. Vitamine hidrosolubile:	
B_1	Vitamina antineuritică (Tiamină)	Decarboxilarea α-cetoacizilor
B_2	Vitamina creşterii (Riboflavină)	Reacţii redox
B_3	Acidul pantotenic	Transport grupe acil (CoA)
B_4	Colina (factorul de creştere)	Fosfolipide
B_5	Vitamina PP (Niacină: Factor PP: amida acidului nicotinic)	Reacţii redox (NAD)
B_6	Vitamina antipelagroasă (Piridoxină)	Transport grupe amino
B_7	Biotină (Bios II, vitamina H)	Transport CO_2
B_9	Acidul folic (acid pteroilglutamic)	Transport grupe C_1
B_{12}	Vitamina antianemică	Transport grupe alchil
H'	Acid p-aminobenzoic	
—	Acidul lipoic	Transport H şi grupe acil
—	Bios I (mezo-inozitol)	—
–	Carnitina	—
C	Vitamina antiscorbutică (acid ascorbic)	Cofactor în reacţia de hidroxilare; tampon redox
P	Vitamina permeabilităţii (Rutină)	
	2. Vitamine liposolubile:	
A	Vitamina antixeroftalmică (Axeroftol)	Ciclul vederii
D	Vitamina antirahitică (Calciferol)	Transportă şi fixează Ca^{2+}
E	Vitamina antisterilităţii (Tocoferol)	Antioxidant al lipidelor
K	Vitamina antihemoragică (Filochinonă)	Sinteza protrombinei

Simptomele moderate ale deficienţei tiaminice includ: confuzie mintală, ataxie (incapacitatea de a realiza un control fin al funcţiilor motorii) şi pierderea coordonării mişcării ochilor.

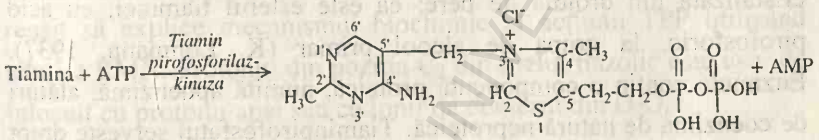
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura vitaminei B_1 a fost determinată prin tratare cu sulfit acid de sodiu, care rupe molecula într-un acid sulfonic al 2,5-dimetil-4-amino-pirimidinei şi 4-metil-5-hidroxietil-tiazol:



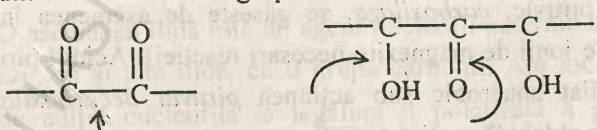
Tiamina | 2,5-Dimetil-4-aminopirimidina | 4-Metil-5-hidroxietil-tiazol

Absorbţia tiaminei se realizează la nivelul intestinului subţire, prin procese active şi pasive; la om absorbţia intestinală este de 5 mg/zi, minimum necesar fiind de 0,9 mg/zi. Absorbţia activă presupune formarea TPP (tiamin-pirofosfat).



În organism tiamina se găseşte liberă (plasmă, LCR) şi esterificată ca TPP (80%), dar şi TTP (trifosfat) şi TMP (monofosfat). Forma predominantă este TPP şi reprezintă forma sub care se stochează pentru scurt timp şi sub care este activă biologic (cocarboxilaza).

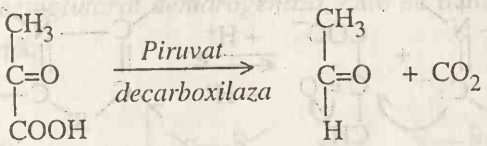
Rol metabolic. Tiamin pirofosfatul este o coenzimă implicată în cataliza reacţiilor de desfacere sau de refacere a legăturilor chimice din vecinătatea unei grupări carbonil:



Legaturile chimice afectate in reactiile la care paricipa tiamin pirofosfatul

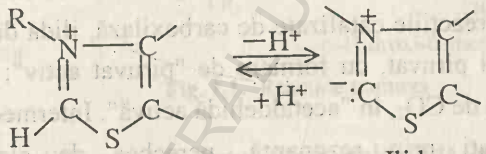
Prima structură indicată în figura de mai sus este caracteristică α-cetoacizilor care, aproape în totalitate, sunt decarboxilați în prezența TPP. În reacția catalizată de o fosfocetolază, se rup ambele legături indicate în cea de-a doua structură, în timp ce reacțiile catalizate de transcetolaze afectează numai legătura C–C, fără a presupune și îndepărtarea grupării –OH. Astfel, pirofosfatul de tiamină (TPP) care se mai numește și *cocarboxilază* este o importantă coenzimă, care catalizează decarboxilarea α-cetoacizilor. De pildă, TPP participă la decarboxilarea acidului piruvic la acetaldehidă în procesul fermentației alcoolice, precum și la formarea de acetilcoenzima A în ciclul acizilor tricarboxilici. Cocarboxilaza a fost izolată în stare cristalizată din drojdia de bere; ea este esterul tiaminei, cu acid pirofosforic, la grupa de alcool primar (K. Lohmann, 1937). Enzimele conțin o componentă proteică, numită apoenzimă, alături de coenzima de natură neproteică. Tiaminpirofosfatul servește drept coenzimă pentru o clasă de enzime care au rolul de a îndepărta grupele aldehidice și de a le transporta pe un alt substrat. Principalele enzime sunt: 1. *α-cetoacid-decarboxilazele*, 2. *α-cetoacid-dehidrogenazele* și 3. *transcetolazele*. Un exemplu îl constituie *piruvat-decarboxilaza* din drojdie care catalizează decarboxilarea acidului piruvic la acetaldehidă și CO_2, în procesul fermentației alcoolice.

Apoenzima (proteina specifică) reacției de decarboxilare a acidului piruvic, *carboxilaza*, se găsește de asemenea în drojdie (alături de ionii de magneziu, necesari reacției). Acidul piruvic este decarboxilat anaerobic sub acțiunea *piruvat decarboxilazei* (EC 4.1.1.1) la aldehidă acetică și CO_2:



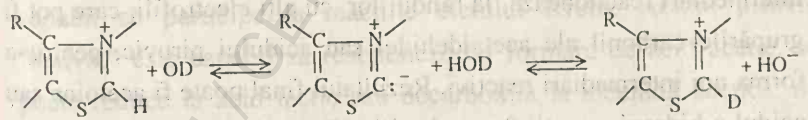
Organismele animale nu pot sintetiza tiamină (de aceea, tiamina este o vitamină pentru animal), dar o pot transforma în pirofosfatul său, adică în cocarboxilază. Când lipseşte vitamina B_1 din hrană se observă o creştere a concentraţiei acidului piruvic în ţesuturi şi apariţia tuturor simptomelor avitaminozei B_1.

Prin reacţii de schimb cu deuteriu s-a găsit că inelul de tiazoliu din tiamină trece, în soluţie neutră, într-o ilidă. R. Breslow a reuşit să explice mecanismul biochimic al acţiunii TPP utilizând tehnica RMN. Protonul din poziţia C_2 din inelul tiazolic este uşor de înlocuit cu protonii apei sau cu ionii de deuteriu din D_2O.

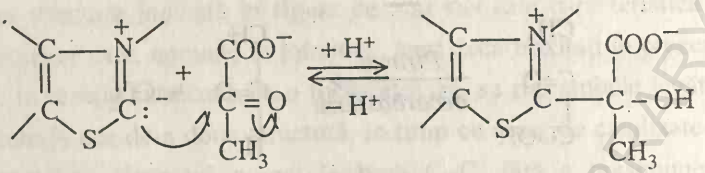


Ilida

Are loc o următoarea reacţie, catalizată de baze:



O asemenea ilidă este un agent nucleofil puternic capabil să reacţioneze, ca şi alte ilide, cu o grupă carbonil. Are loc aşadar o reacţie de adiţie nucleofilă la legătura π polarizată a grupărilor carbonil ale diverselor substanţe având rol de substrat pentru a forma intermediari reactivi de tipul următor:



Tiamina singură, fără a fi fosforilată şi legată de o grupare proteică dintr-o enzimă, poate promova decarboxilarea piruvatului la acetaldehidă şi bioxid de carbon. Datorită structurii sale de ilidă, tiamin-pirofosfatul poate juca rol de coenzimă în două tipuri de reacţii din cadrul metabolismului zaharurilor, în care, evident, are loc îndepărtarea sau transferul unor grupări carbonil. Acestea sunt *reacţii de decarboxilare a α-ceto-acizilor* şi, de asemenea, *reacţii de formare sau de degradare a α-cetolilor*. Astfel, tiamin-pirofosfatul reacţionează cu cetoacizii de tipul acidului piruvic, $CH_3COCOOH$, acidului α-cetoglutaric, $HOOC\text{-}CH_2CH_2CO\text{-}COOH$ sau cu ribulozo-5-fosfatul. În reacţiile catalizate de carboxilază, ilida dă o reacţie de adiţie la ionul piruvat, cu formare de "piruvat activ"; acesta trece, prin eliminare de CO_2, în "acetaldehidă activă". Intermediarii reactivi sunt stabilizaţi prin rezonanţă, perechea de electroni fiind delocalizată în inelul tiazolic, care este deficitar în electroni. Aceşti intermediari reacţionează, la rândul lor, cu alţi electrofili, care pot fi grupările carbonil ale acetaldehidei sau acidului piruvic, pentru a forma noi intermediari reactivi. Rezultatul final poate fi acetoina sau acidul α-hidroxi-α-metil-ß-ceto-butiric (fig. 1.1).

Acetaldehida activă formată în aceste reacţii poate elimina acetaldehida, regenerând coenzima. Piruvatul activ a putut fi izolat din sistemul enzimatic; el există în unele preparate de carboxilază naturală. Decarboxilarea oxidativă a acizilor piruvic şi α-cetoglutaric se realizează astfel în prezenţa enzimelor *piruvic dehidrogenază* şi,

respectiv, *α-cetoglutarat dehidrogenază*, care au tiamin-pirofosfatul drept coenzimă.

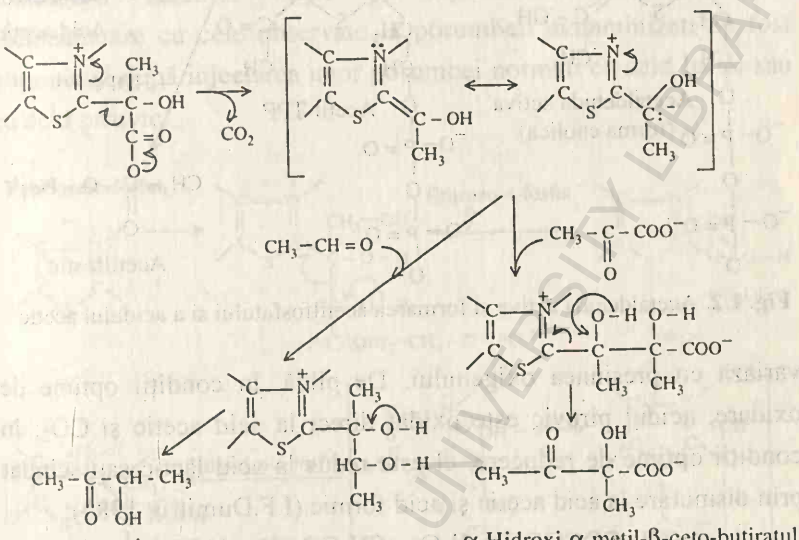


Fig. 1.1. Reactiile tiaminei

În condiții aerobe, restul de acetaldehidă este tranferat pe acidul lipoic și apoi pe CoA, rezultând acetil~CoA, produs activ, capabil să participe la reacțiile ciclului Krebs. Acidul piruvic "activat" este capabil să reacționeze cu formare de acid acetic, se poate reduce la acid lactic sau decarboxila la aldehidă acetică; de asemenea, poate suferi o reacție de dismutare (similară reacțiilor de disproporționare din chimia anorganică, în care atomii de carbon își modifică starea de oxidare) cu formare de acizi lactic și acetic sau o reacție de carboxilare cu formare de acid oxalilacetic. Baron și Lyman au arătat în anul 1939 că gradul în care TPP catalizează o anumită reacție din metabolismul acidului piruvic

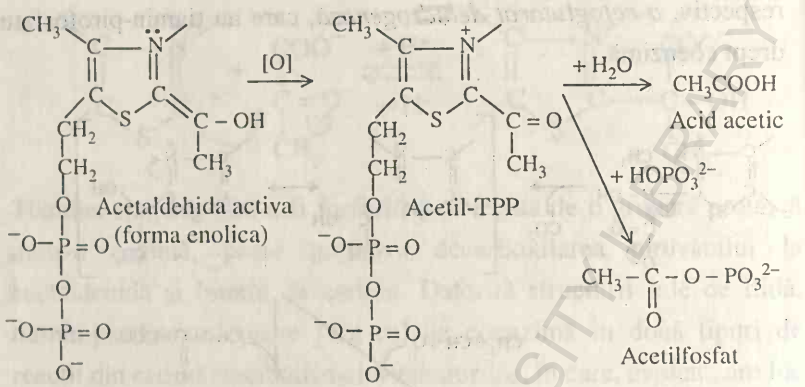


Fig. 1.2. Acetaldehida activa si formarea acetilfosfatului si a acidului acetic

variază cu presiunea oxigenului. De pildă, în condiții optime de oxidare, acidul piruvic este oxidat direct la acid acetic şi CO_2; în condiții optime de reducere, el este redus la acid lactic sau scindat prin dismutare la acid acetic şi acid formic (I.F.Dumitru, 1980):

$$CH_3\text{-}COCOOH + H_2O = CH_3COOH + HCOOH$$

Aceast explică legătura dintre cele două căi alternative de producere a energiei în celula eucariotelor: fermentația (glicoliza) şi respirația. Însă aceiaşi intermediari de tipul acidului piruvic activ sau al acetaldehidei active pot conduce, prin oxidare, la acid acetic sau la acetilfosfat (fig.1.2).

Acetil-TPP ce apare ca intermediar în reacția de mai sus poate proveni şi din reacția TPP cu fructoza (fig. 1.3). Întreaga schemă de reacții care explică participarea complexă a vitaminei B_1 sub forma coenzimei TPP la metabolismul zaharurilor este redată schematizat în fig. 1.4. Funk, în 1914, a sesizat pentru prima dată rolul TPP în metabolismul glucidelor, fără a preciza mecanismul biochimic prin care acesta îşi manifestă activitatea. Mai târziu, s-a

demonstrat că în creierul porumbeilor avitaminizați se găsesc cantități mărite de acid piruvic și că bradicardia acestora se datorează acumulării acidului lactic în organism. Astfel, convulsii asemănătoare cu cele observate la porumbeii avitaminizați au fost obținute și după injectarea unor porumbei normali cu acid lactic sau cu acid piruvic.

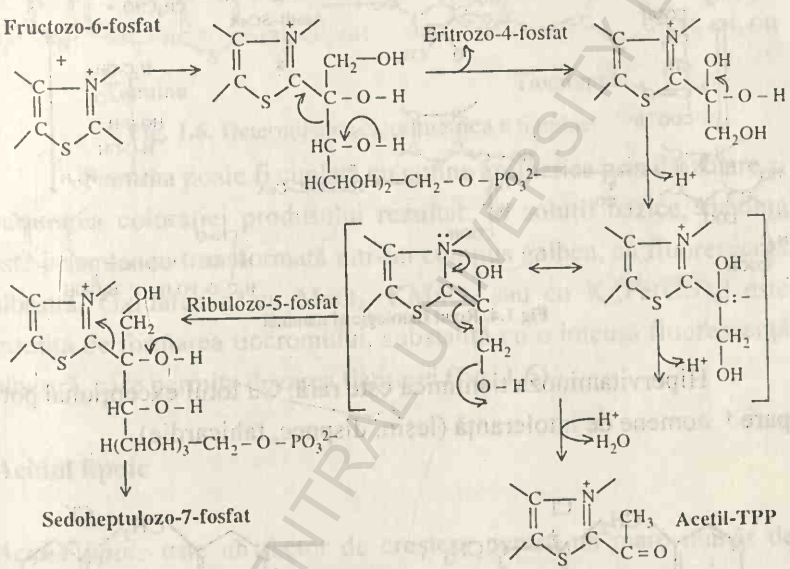


Fig. 1.3. Participarea TPP la formarea sedoheptulozo-7-fosfatului

Deficiența în vitamina B_1 poate fi cauzată de malnutriție, defecte de absorbție, pierderi vitaminice datorate terapiei cu diuretice, hemodializei și diareei.

Simptomele deficienței tiaminice pot fi induse de către analogii tiaminei, cu rol antivitaminic, cum ar fi piritiamina și hidroxitiamina (fig. 1.5).

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

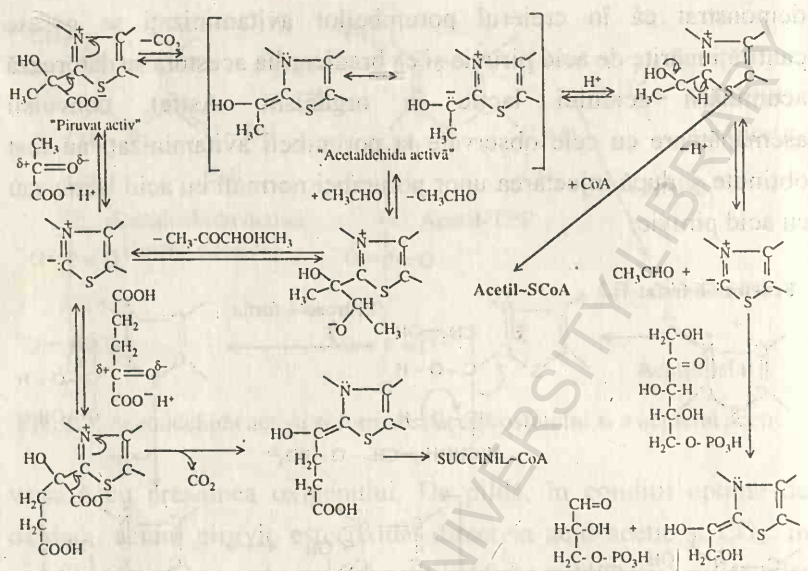


Fig 1.4. Rolul fiziologic al tiaminei

Hipervitaminoza tiaminică este rară. Cu totul excepțional pot apare f nomene de intoleranță (leşin, dispnee, tahicardie).

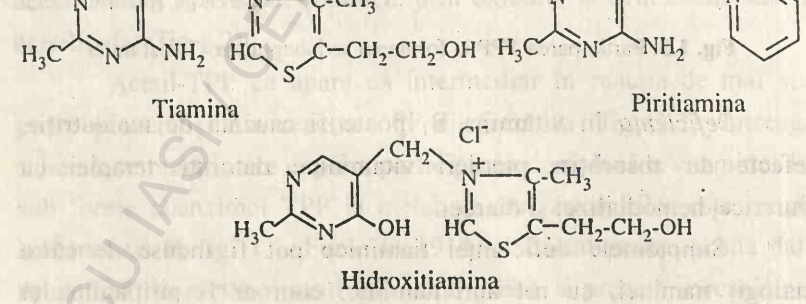


Fig. 1.5. Tiamina si antivitaminele sale

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Determinarea conținutului de tiamină se poate realiza prin metode chimice sau microbiologice. Metodele microbiologice se bazează pe faptul că multe microorganisme necesită tiamină pentru creștere. Tiamina accelerează totodată fermentația alcoolică a drojdiei de bere.

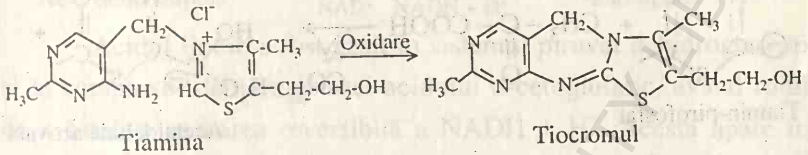
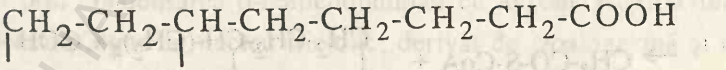


Fig. 1.6. Determinarea fluorimetrica a tiaminei

Tiamina poate fi cuplată cu amine aromatice prin diazotare și măsurarea coloratiei produsului rezultat. În soluții bazice, tiamina este instantaneu transformată într-un compus galben, cu fluorescență albastră. Oxidarea ei cu MnO_2, $KMnO_4$ sau cu $K_3[Fe(CN)_6]$ este însoțită de formarea tiocromului, substanță cu o intensă fluorescență albastră, care permite dozarea tiaminei (fig. 1.6).

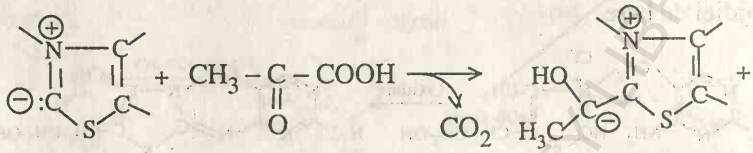
Acidul lipoic

Acidul lipoic este un factor de creștere pentru un mare număr de bacterii și protozoare. Carența sa la om nu este cunoscută, deoarece acesta se găsește în majoritatea alimentelor. A fost izolat de către Reed și colegii săi în stare cristalizată din ficat. Este o disulfură ciclică numită acid 6,8-ditiooctanoic:



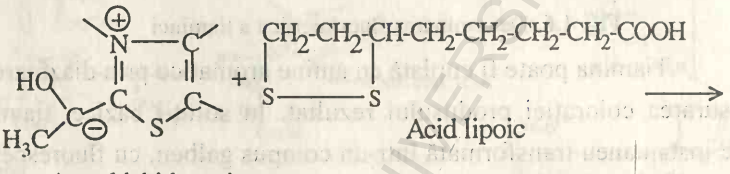
Acidul lipoic

Acidul lipoic catalizează decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic (sau a celui α-cetoglutaric). Această conversie implică formarea unui complex al aldehidei cu pirofosfatul de tiamină (TPP) şi reacţia sa ulterioară cu acidul lipoic.



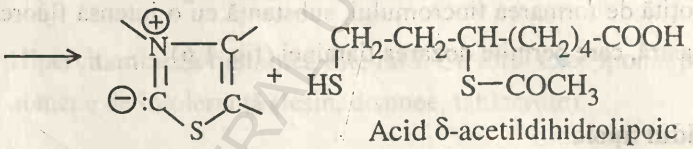
Tiamin-pirofosfat

Acetaldehida activata



Acetaldehida activata

Acid lipoic



Tiamin-pirofosfat

Acid δ-acetildihidrolipoic

Grupa acetil este în continuare transferată coenzimei A (fig. 1.7).

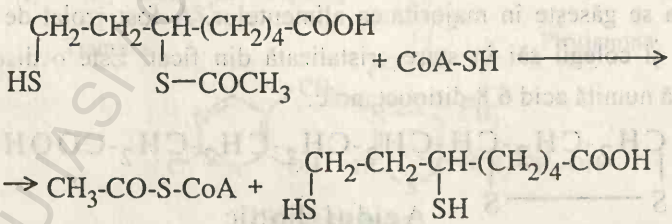
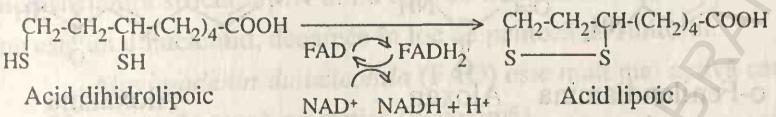


Fig. 1.7. Rolul fiziologic al acidului lipoic

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ

Acidul lipoic redus este reoxidat de către dehidrogenaza acidului lipoic, o enzimă flavoproteică, cuplată cu reducerea NAD^+.

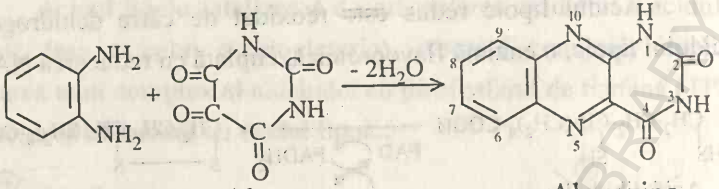


Acid dihidrolipoic — Acid lipoic

Acidul lipoic a fost găsit în sistemul piruvat dehidrogenazei şi în complexul dehidrogenazei acidului α-cetoglutaric, având rolul de a cataliza oxidarea reversibilă a NADH + H^+. Acesta apare în ţesuturi asociat cu proteinele printr-o legătură covalentă care se formează între grupa sa carboxilică şi grupa ε-amino a unui rest lizinic dintr-o proteină. Legătura se numeşte şi lipoamidică. Amida acidului lipoic este mai activă decât acidul liber. Forma redusă a acidului lipoic nu se întâlneşte în stare liberă în ţesuturile animale, vegetale şi în microorganisme. Separarea sa se realizează printr-o hidroliză parţială cu acid performic sau prin acţiunea enzimelor proteolitice. Acidul lipoic constituie o importantă componentă a dehidrogenazelor α-cetoacizilor. Este produs în cantităţi însemnate de celulele algei *Chlorella*, cultivată în condiţii aerobe.

Vitamina B_2

Vitamina B_2 (riboflavina) este un derivat al *aloxazinei*, structura sa fiind stabilită de R. Kuhn şi P. Karrer în 1935. Aloxazina se obţine sintetic prin condensarea o-fenilendiaminei cu aloxan. Riboflavina este alcătuită dintr-un nucleu triciclic, derivat de izoaloxazină şi o catenă laterală de ribitol.



o-Fenilendiamina Aloxan Aloxazina

Vitamina B_2 se găseşte, în concentraţii foarte mici, în toate celulele vii, dar apare în cantităţi cava mai mari în drojdia de bere, în lapte (1 g la 5400 litri de zer), în ouă şi în plante verzi. În aceste materiale a fost identificată graţie culorii ei galbene şi fluorescenţei verzi. S-a crezut iniţial că există mai multe vitamine B_2 sau flavine (lactoflavina, ovoflavina etc.). Mai târziu s-a recunoscut identitatea lor şi s-a păstrat numai numele de riboflavină pentru această vitamină.

Riboflavina este redusă uşor, dar reversibil, la leucoriboflavină (incoloră), fluorescentă care, în prezenţa O_2 trece din nou în riboflavină.

În organism, riboflavina se găseşte sub formă liberă (plasmă, lapte, urină şi retină), cât şi legată (FMN, FAD, enzime flavinice) în diferite ţesuturi ca rinichi, ficat, inimă şi muşchi. FMN este riboflavina fosforilată.

Rol metabolic. Riboflavina intră în structura formelor sale coenzimatice, FMN şi FAD. Transformarea sa în ester monofosforic (FMN), are loc în toate celulele organismului, sub acţiunea unei flavokinaze:

$$\text{Riboflavina} \xrightarrow[-\text{ADP}]{+\text{ATP (Flavokinaza)}} \text{FMN} \xrightarrow[-\text{PPa}]{+\text{ATP (Flavin-adenin-pirofosforilaza)}} \text{FAD}$$

Prin unirea FMN cu acidul adenozin-5'-fosforic (AMP), sub influența flavin-adenin-pirofosforilazei, se formează FAD-ul. După nomenclatura strictă, FMN-ul nu este un mononucleotid, iar FAD-ul nu este un dinucleotid, deoarece în loc de pentoză au ribitolul.

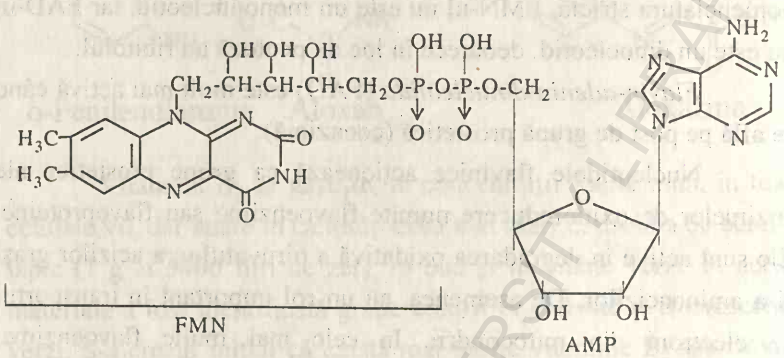
Flavin-adenin-dinucleotida (FAD) este mult mai activă când se află pe post de grupă prostetică (coenzimă).

Nucleotidele flavinice acționează ca grupe prostetice ale enzimelor de oxidoreducere numite flavoenzime sau flavoproteine. Ele sunt active în degradarea oxidativă a piruvatului, a acizilor grași și a aminoacizilor. De asemenea, au un rol important în transportul de electroni din mitocondrii. In cele mai multe flavoenzime, nucleotida flavinică este strâns dar necovalent legată de proteină, cu excepția succinat dehidrogenazei, în care FAD este legată covalent de un rest de histidină din lanțul polipeptidic. Coenzimele flavinice pot exista în trei stări de oxidare diferite, evidențate pe cale spectrală, ceea ce explică funcțiile lor catalitice. Astfel, în procesele catalizate de către enzimele flavinice, s-a găsit o formă oxidată intens colorată în galben, alături de forma redusă monoelectronică (care poate fi roșie sau albastră) și de forma redusă, bielectronică, incoloră, ceea ce permite măsurarea activității acestor coenzime.

$FADH_2$ poate reacționa direct cu O_2 pentru a produce H_2O_2. În cazul dehidrogenazelor, $FADH_2$ nu vine în contact cu oxigenul sau acesta nu este un intermediar al reacțiilor de dehidrogenare.

În general, dehidrogenazele sunt enzime legate de membranele celulare sau mitocondriale, iar transferul electronic se facecătre un acceptor de electroni, de tipul chinonelor sau citocromilor (Fe^{2+}/Fe^{3+}). Stabilitatea semichinonelor flavinice FAD·

sau FMN· le conferă capacitatea de a interacționa cu acceptorii din sistemele de transport de electroni.



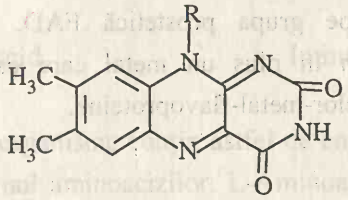
Flavin-adenin-dinucleotida (FAD)

Alte flavoproteine interacționează cu O_2 molecular drept substrat, fie ca acceptor de electroni în reacțiile redox catalizate de oxidaze, fie ca sursă de atomi de oxigen pentru oxigenaze.

Sinteza FMN și FAD-ului este stimulată de hormoni tiroidieni și suprarenalieni. Hipotiroidismul încetinește conversia riboflavinei la FMN și FAD. Unii compuși psihotropi (fenotiazine) inhibă biosinteza acestora.

Flavinenzimele participă la reacții de oxidoreducere, deoarece ciclul izoaloxazinic poate suferi reduceri reversibile, prin fixarea temporară la N_1 și N_{10}, a doi atomi de hidrogen, cu deplasarea dublei legături. Hidrogenul se leagă de inelul izoaloxazinic al restului de riboflavină, care trece într-un dihidro-derivat. Atomii de hidrogen sunt preluați de la diferite substraturi reduse (SH_2), cu care intră în reacție și care se oxidează (S_{ox}). Reducerea flavinelor se desfășoară în mai multe etape, la care participă radicali liberi de tipul

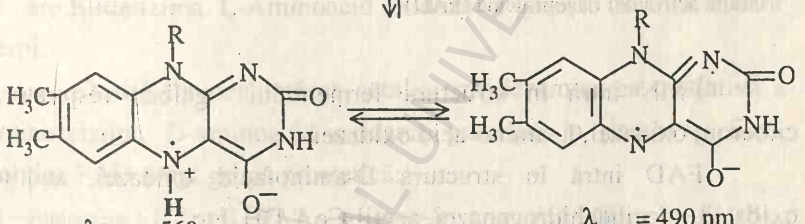
semichinonelor. Aceşti radicali liberi pot fi puşi în evidenţă prin tehnica rezonanţei de spin electronic (RES).



FAD sau **FMN**

$\lambda_{max} = 450$ nm

$+ H^+ + 1e^-$ ⇕ $- H^+ - 1e^-$

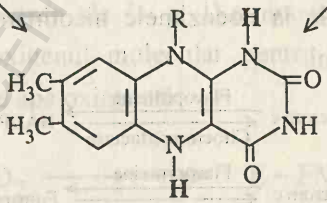


$\lambda_{max} = 560$ nm

$\lambda_{max} = 490$ nm

Semichinona FAD sau **FMN**

$+ 1e^- + H^+$ ↘ ↙ $+ 1e^- + 2 H^+$



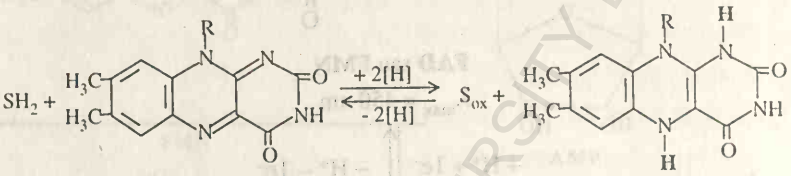
(incolor)

$FADH_2$ sau **$FMNH_2$**

FMN şi FAD se găsesc în celulă sub formă de combinaţii cu proteinele, constituind sisteme enzimatice de mare importanţă în

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

oxidările celulare — flavinenzimele sau flavoproteinele (peste 60). *Succinat-dehidrogenaza* este un exemplu de flavoenzimă; ea catalizează îndepărtarea a doi atomi de hidrogen de la acidul succinic şi transferul lor pe grupa prostetică FAD. Multe din aceste flavinenzime conţin în plus un metal care este esenţial pentru funcţionarea enzimelor-metal-flavoproteine.



Grupa activa din flavoproteina (FAD) $FADH_2$

FMN intră în structura fermentului galben respirator, citocrom oxidazei, L-amino-acid oxidazei.

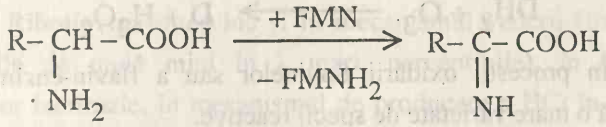
FAD intră în structura D-amino-acid oxidazei, xantin oxidazei, succindehidrogenazei, acetil-CoA-DH, etc.

Funcţia de bază a flavoproteinelor în lanţul reacţiilor oxido-reducătoare ale respiraţiei celulare constă în transportul electronilor (şi hidrogenului) de la coenzimele nicotinamidei reduse şi de la succinat la citocromi:

$$1)\ NADPH + 2(Fe^{3+})Citocrom\ c \underset{Citocromreductaza}{\overset{Flavoproteina}{\rightleftharpoons}} NADP^+ + 2(Fe^{2+})Citocrom\ c + 2H^+$$

$$2)\ Succinat + 2(Fe^{3+})Citocrom\ c \underset{Succinatdehidrogenaza}{\overset{Flavoproteine}{\rightleftharpoons}} Fumarat + 2(Fe^{2+})Citocrom\ c + 2H^+$$

FMN este constituientul citocrom-c-reductazei şi al dehidrogenazei α-L-aminoacizilor naturali:



L- Aminoacid Iminoacid

Deşi multe organisme conţin astfel de enzime, ele au un rol minor în metabolismul aminoacizilor. L-Aminoacid dehidrogenază, numită şi L-aminoacid oxidaza, este specifică pentru dezaminarea L-aminoacizilor, iar reacţia corectă ar trebui scrisă astfel:

$$\text{L – Aminoacid} + H_2O + E - FMN \longrightarrow \alpha\text{-cetoacid} + NH_3 + E - FMNH_2$$

în care E = enzima. L-Aminoacid oxidaza se găseşte în veninul unor şerpi.

O altă flavoenzimă ce catalizează dezaminarea oxidativă a aminoacizilor, D-aminoacid oxidaza, prezentă în rinichi şi ficat, conţine FAD drept grupă prostetică:

$$\text{D – Aminoacid} + H_2O + E - FAD \longrightarrow \alpha\text{-cetoacid} + NH_3 + E - FADH_2$$

Se presupune că are rolul de a degrada D-aminoacizii care apar la distrugerea peptidoglicanilor din peretele celular al bacteriilor intestinale. Formele reduse ale L- şi D-aminoacid oxidazelor pot reacţiona direct cu oxigenul molecular pentru a reface formele oxidate, cu eliberare de apă oxigenată:

$$E - FMNH_2 + O_2 \longrightarrow E - FMN + H_2O_2$$

$$E - FADH_2 + O_2 \longrightarrow E - FAD + H_2O_2$$

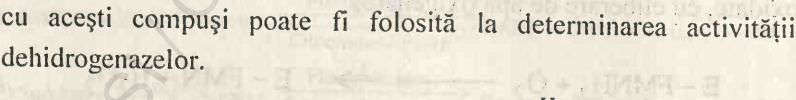
Flavinenzimele de tipul glucozo-oxidaza (EC 1.1.3.4), glicolat oxidază (EC 1.1.3.1), D şi L-aminoacid oxidazele (EC 1.4.3.2), etc. au aşadar ca produs secundar H_2O_2:

$$DH_2 + O_2 \longrightarrow D + H_2O_2$$

În procesul oxidării flavinelor sau a flavin-enzimelor se formează o mare varietate de specii reactive.

FAD intervine de asemenea în dehidrogenarea acizilor graşi care este primul pas în procesul de oxidare a acestora. Există patru tipuri diferite de acil-CoA dehidrogenaze, fiecare fiind specifică unor acizi graşi cu o anumită lungime a catenei. În reacţie, participă tioesterul acidului gras cu coenzima A, iar $FADH_2$ din dehidrogenază nu reacţionează direct cu oxigenul, ci îşi transferă electronii lanţului respirator, prin intermediul unei alte flavoproteine, numită flavoproteină de transport de electroni. Aceasta, la rândul său, trimite electronii unor alţi purtători de electroni, de tipul coenzimei Q sau vitaminei K.

Enzimele de oxidoreducere conţinând flavine pot fi împărţite în două clase: *dehidrogenaze şi oxidase*. Deosebirea dintre ele este următoarea: flavin-dehidrogenazele în forma redusă au o foarte slabă tendinţă de a reacţiona cu oxigenul molecular pentru a fi reoxidate. Dimpotrivă, oxidazele flavinice în formă redusă reacţionează cu oxigenul molecular cu formare de apă oxigenată. Totuşi, dehidrogenazele pot fi oxidate de către albastrul de metilen, fericianură, 2,6-diclorindofenol şi alţi acceptori de electroni. Reacţia cu aceşti compuşi poate fi folosită la determinarea activităţii dehidrogenazelor.



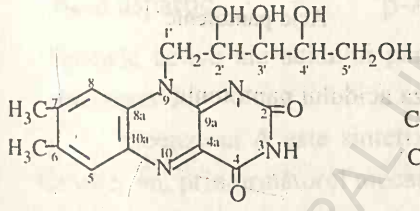
$$R-\overset{\beta}{C}H_2-\overset{\alpha}{C}H_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-S-CoA + E-FAD \longrightarrow R-\underset{\underset{H}{|}}{C}=\overset{\overset{H}{|}}{C}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CoA + E-FADH_2$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

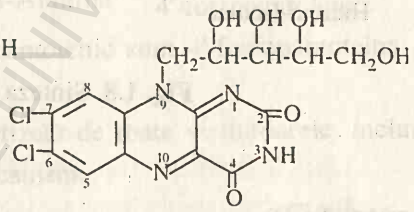
Riboflavina intervine şi în mecanismul vederii (transformă lungimile de undă mici în λ mari, perceptibile), în fiziologia glandelor lacrimale, în mecanismul de producere a HCl în mucoasa gastrică, în activitatea altor vitamine şi hormoni (conservă activitatea vitaminei B_1 şi este legată de activitatea hormonilor corticosuprarenali şi a insulinei).

Hipovitaminoza se manifestă prin apariţia unor leziuni ale mucoasei gastrice, buco-faringiene, leziuni cutanate.

La om, carenţa este cunoscută sub denumirea de "pelagră fără pelagră", cu simptomele: stomatită angulară, leziuni umede la colţurile gurii şi nasului, conjunctivită, cataracte, blefarită, creşterea volumului limbii.



Riboflavina (6,7-dimetil-9-(D-1'-ribitil)-izoaloxazina



Diclorriboflavina

Hipervitaminoza nu prezintă efecte toxice. Megadozele determină: crampe musculare, poliurie, utilizarea şi metabolizarea defectuoasă a altor vitamine, datorită competiţiei pentru compuşi de fosforilare.

Activitate antagonistă prezintă diclorriboflavina şi izoriboflavina, în molecula căreia o grupă metil are o poziţie diferită faţă de riboflavină, care reduc creşterea şobolanilor. Efectul lor este contracarat de către riboflavină.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

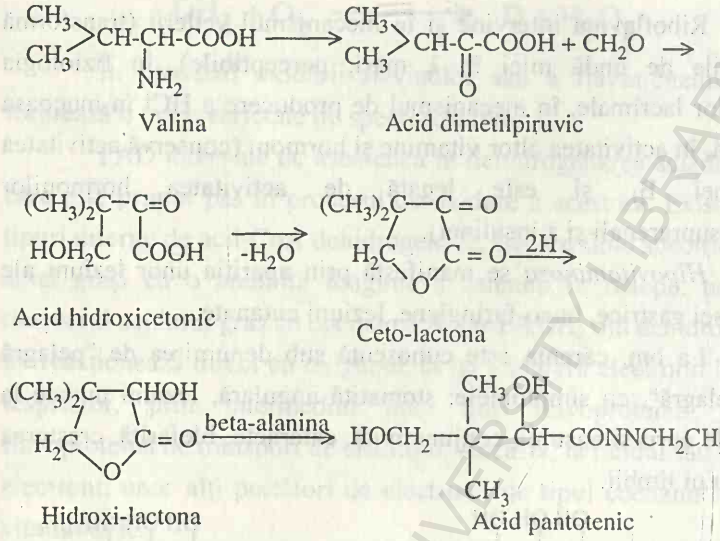


Fig. 1.8. Sinteza acidului pantotenic

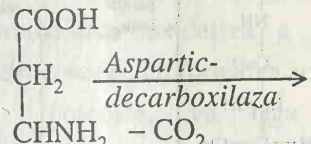
Vitamina B_3

Vitamina B_3 (acidul pantotenic, vitamina B_x, factor hepatic, factor antidermatitic al găinilor), un derivat al β-alaninei, este larg răspândit în natură şi este indispensabil pentru creşterea drojdiei de bere, a bacteriilor şi a animalelor superioare. Lipsa acestei vitamine provoacă dermatite, tulburări de creştere, albirea părului, necroza glandelor suprarenalelor, hemoragie etc. Lipsa acestuia din hrana animalelor tinere provoacă o încetare a creşterii. Are deci funcţia unei vitamine şi a unei auxine.

BCU "ION CREANGĂ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În plante şi în microorganisme se formează probabil din valină şi din β-alanină; sinteza "in vitro" urmează aceeaşi cale (fig. 1.8).

β-Alanina poate fi sintetizată pe două căi: prin decarboxilarea acidului aspartic şi pe calea semialdehidei malonice, care va fi descrisă la *metabolismul aminoacizilor*:



Acid aspartic β-Alanina

Absorbţia se realizează la nivelul intestinului şi, imediat, tot în aceste celule, este fosforilat la gruparea de alcool primar, formând acidul 4'-fosfopantotenic.

Formele active ale acidului pantotenic sunt 4'-fosfopantoteina şi coenzima A.

Coenzima A este sintetizată de toate vieţuitoarele, inclusiv de către om, prin următorul mecanism:

$$\text{Acid pantotenic} \xrightarrow[\text{- ADP}]{\text{+ ATP}} \text{Acid 4'-fosfopantotenic} \xrightarrow[\text{(ATP sau CTP)}]{\text{+ Cisteina}}$$

$$\rightarrow \text{4'-fosfopantotenil-cisteina} \xrightarrow[\text{- } CO_2]{} \text{4'-fosfopantoteina} \xrightarrow[\text{- } PP_a]{\text{+ ATP}}$$

$$\rightarrow \text{Difosfo-coenzima A} \xrightarrow[\text{- ADP}]{\text{+ ATP}} \text{CoASH}$$

Coenzima A, sub formă de acetil-CoA, serveşte la acetilarea unor substraturi, de aceea a fost denumită şi "acid acetic activ". Pentru detoxifierea unor substanţe străine, cum sunt anilina şi sulfanilamida, acestea sunt acetilate de către acetil-CoA înainte de a fi eliminate. Coenzima acetilării sau coenzima A este amplu

răspândită şi participă în procesele biologice în care intervine ionul acetat (fig. 1.9).

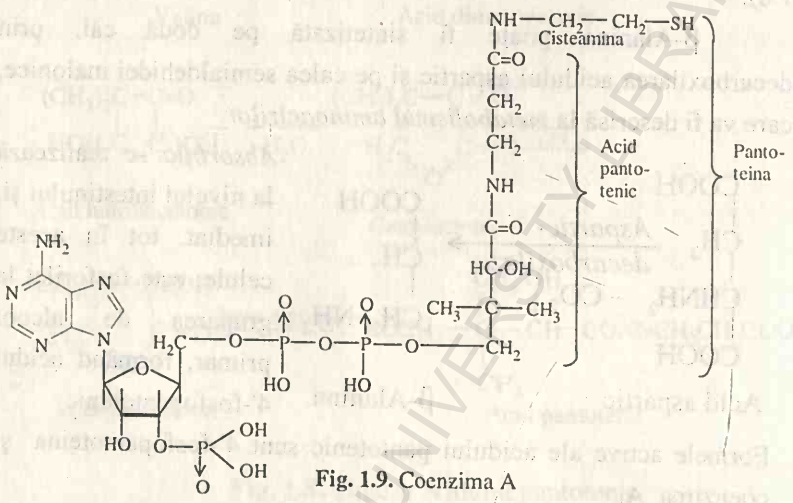


Fig. 1.9. Coenzima A

Organismele mamiferelor nu sintetizează acid pantotenic. Tulburările provocate de lipsa acidului pantotenic din hrana acestora se datoresc încetării producţiei de coenzimă A. În coenzima A, pantoteina este legată de adenozină, prin intermediul unui rest de acid pirofosforic. Un al treilea rest de acid fosforic este legat de restul de riboză.

Rol metabolic. Coenzima A este purtătoare de grupe acil în organismele vii, în reacţii de tipul oxidării acizilor graşi, sintezei acizilor graşi, oxidării acidului piruvic şi acetilărilor biologice. Pentru activitatea coenzimei A este responsabilă, în primul rând, gruparea SH din restul marginal de cisteamină. De această grupă se leagă acetilul, sub formă de tioester, care este în continuare transferat unui acceptor.

a) *Coenzima A* (CoA-SH) are aşadar un rol important în metabolismul glucidic, lipidic şi protidic fiind transportor de grupe acil. Pentru aceasta, gruparea sulfhidril a coenzimei A este acilată cu formarea unui tioester (CoA-S-COR). Legătura tioesterică este echivalentă ca energie cu o legătură macroergică din ATP, care este bateria de energie a celulei.

— în metabolismul glucidic — leagă restul acetil, provenit din decarboxilarea oxidativă a piruvatului, sub acţiunea *piruvat-dehidrogenazei*, cu formarea acetil coenzimei A.

Totodată, va lega radicalul succinil rezultat din decarboxilarea oxidativă a acidului α-cetoglutaric, sub acţiunea α-*cetoglutarat-dehidrogenazei*, cu formarea $HOOC-CH_2-CH_2-CO-SCoA$.

— în metabolismul lipidic — participă la activarea acizilor graşi şi transportul grupelor acil în procesul de degradare.

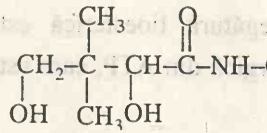
— în metabolismul protidic — transportă resturile acil provenite de la glicină, serină şi treonină cu formarea acetil-CoA; resturile de la fenilalanină, tirozină, leucină la acetoacetil CoA şi mai departe la acetil CoA şi de la metionină, izoleucină şi valină la metilmalonil-CoA şi, mai departe, la succinil-CoA.

Acetil-coenzima A se formează în procesul de oxidare enzimatică a acidului piruvic sau a acizilor graşi. Însă ea poate fi sintetizată direct din ionii acetat în prezenţa *acetil-CoA sintetazei*:

$$ATP + \text{Coenzima A} + \text{Acetat} \rightleftarrows AMP + \text{Acetil-coenzima A} + \text{Pirofosfat}$$

b) *4'-fosfopanteteina* — legată prin legătură fosfo-diesterică de un rest de serină din proteine acil transportoare (ACP — Acyl Carrier Protein) sau din multienzim-complexul numit *acid gras-*

sintetaza din microorganisme şi, respectiv, celulele animale (vezi *metabolismul* compuşilor respectivi).



Pantoiltaurina, analogul sulfonic al acidului pantotenic, inhibă creşterea microorganismelor dependente de acest acid, în timp ce acidul pantotenic determină reluarea creşterii dacă este introdus în mediu.

$$\text{Colina} + \text{ATP} \xrightarrow{\textit{colin kinaza}} \text{fosfocolina} + \text{ADP}$$

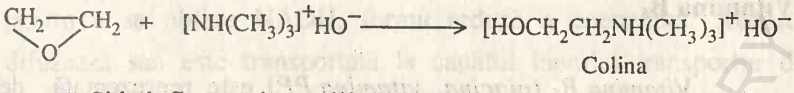
$$\text{Fosfocolina} + \text{CTP} \xrightarrow[\textit{transferaza}]{\textit{fosfocolincitidil}} \text{CDP-colina} + \text{PPa}$$

$$\text{CDP-colina} + \text{diacilglicerol} \xrightarrow[-\text{CMP}]{\textit{fosfocolin-transferaza}} \text{fosfatidilcolina}$$

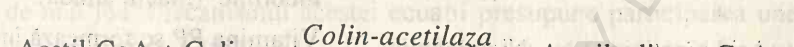
Carența, realizată numai după administrare de antagonişti, se manifestă prin stare de oboseală, ameţeli, hipotonie musculară, tulburări gastrointestinale (gastrite), scăderea rezistenței la infecții. De obicei, deficiența de acid pantotenic este însoțită şi de deficiența altor vitamine. Apar deficiențe în capacitatea de acetilare, eliminarea crescută de 17-cetosteroizi şi alte vitamine hidrosolubile.

Vitamina B_4 (colina)

Vitamina B_4 (colina) se întâlneşte în organismul animal combinată cu acid glicerin-fosforic şi cu acizi graşi, sub formă de lecitină. Sintetic se obține din etilen-oxid şi trimetil-amină:

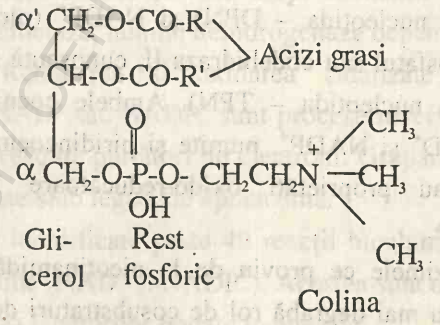


Sub influența bacteriilor de putrefacție sau prin fierbere cu $Ba(OH)_2$, colina elimină o moleculă de apă și trece în *neurină*, $[CH_2=CH-N^+(CH_3)_3]OH^-$, care se găsește printre ptomaine, bazele rezultate la putrezirea proteinelor.



Acetilcolina, $(CH_3)_3N^+-CH_2-CH_2-OCOCH_3$, are, în concentrații mici, o acțiune de scădere puternică a tensiunii arteriale și provoacă o contracție a mușchilor comandați de sistemul parasimpatic. Are, de asemenea, un rol important în mișcările peristaltice ale intestinului.

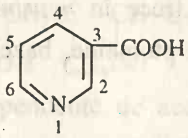
Fosfatidilcolinele sunt sintetizate în țesuturile animale plecând de la colina din hrană. Colina intră în componența fosfogliceridelor care servesc drept componente membranare și drept lipoproteine de transport.



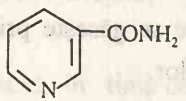
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina B_5

Vitamina B_5 (niacina, vitamina PP) este reprezentată de doi compuşi, derivaţi de la piridină, acidul nicotinic (niacina) şi amida acidului nicotinic (niacin amida).



Acid nicotinic



Nicotinamida

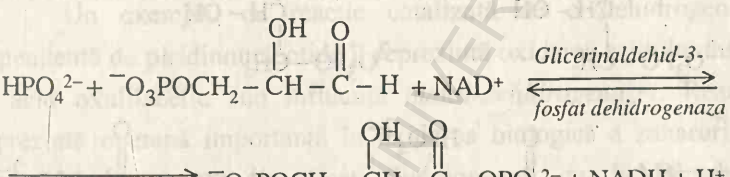
Vitamina PP se formează în organism şi din triptofan, după o schemă mai complicată; din 60 mg triptofan rezultă însă numai 1 mg acid nicotinic. Un aport normal de triptofan poate deci preveni carenţa în niacină. Pelagra a fost răspândită în Ţările Române în condiţiile consumului excesiv de porumb, cereală deficitară în triptofan. Experienţele pe animale au arătat că o dietă bogată în carne, care conţine mari cantităţi de triptofan, previne carenţa în vitamina PP.

Rol metabolic. Nicotinamida acţionează în reacţiile de oxidoreducere din organism sub forma a două coenzime, NAD^+ (nicotinamid-adenin-dinucleotida sau codehidraza I, numită şi difosfopiridin nucleotida – DPN) şi $NADP^+$ (nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfatul sau codehidraza II, cunoscută şi sub numele de trifosfopiridin nucleotida – TPN). Ambele coenzime, derivaţi ai piridinei, NAD^+ şi $NADP^+$, numite şi piridincoenzime sau piridin-nucleotide, au proprietăţi oxido-reducătoare în cadrul unor dehidrogenaze.

Coenzimele ce provin de la nicotinamidă sunt reducători biologici şi au mai degrabă rol de cosubstraturi decât de coenzime adevărate. Cea mai cunoscută funcţie a NAD^+ este aceea de a accepta

doi electroni şi un proton de la un substrat care se oxidează biologic, pentru a se obține NADH, forma redusă a coenzimei. Aceasta difuzează sau este transportată la capătul lanțului transportor de electroni din celulă şi reoxidată de către acceptorul final de electroni din organismele aerobe, O_2, cu formarea simultană de ATP.

Obținerea acidului difosfogliceric din glicerin aldehid-3-fosfat presupune reducerea NAD^+ la NADH + H^+, conform ecuației de mai jos. Mecanismul acestei ecuații presupune participarea unei grupări –SH din molecula enzimei. Astfel, gruparea –SH reacționează cu gruparea aldehidică a glicerinaldehid-3-fosfatului pentru a forma un tiosemiacetal, care este de fapt o moleculă oxidată.



Acil-enzima rezultată reacționează în continuare cu acidul fosforic sau cu ionii de fosfat pentru a forma acidul 1,3-difosfogliceric sau sărurile acestuia.

Piridin-nucleotidele servesc drept coenzime pentru o mare clasă de oxidoreductaze, numite dehidrogenaze dependente de NAD^+ sau $NADP^+$. Reducerea şi oxidarea catalizate de enzimele dependente de NAD^+ sau $NADP^+$ sunt procese reversibile. În aceste procese, ele servesc de purtători de electroni. Gruparea prostetică în aceste enzime este slab legată de apoenzimă.

Au fost identificate peste 40 reacții biochimice dependente de aceste coenzime (NAD^+ şi $NADP^+$). Acestea sunt de tipul:

1. Sinteza legăturilor bogate în energie.

2. Metabolismul acidului piruvic.

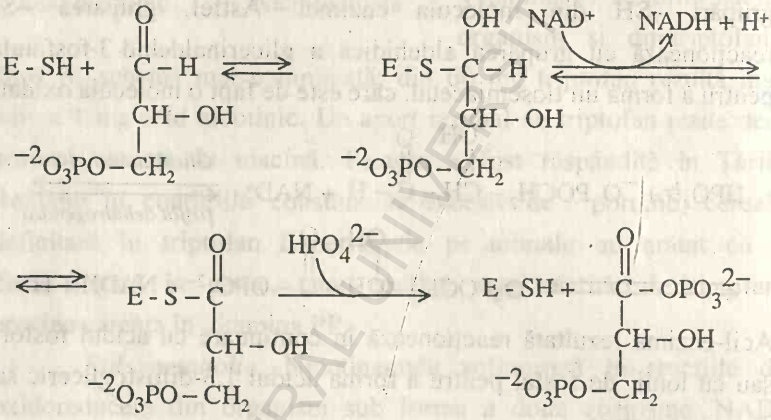
3. Metabolismul pentozei.

4. Metabolismul lipidelor.

5. Glicoliza.

6. Metabolismul azotului (dezaminarea oxidativă a aminoacizilor)

7. Fotosinteza.



NAD^+ (Codehidraza I) a putut fi sintetizată prin combinarea enzimatică a mononucleotidei cu acid adenozin-trifosforic:

Mononucleotida nicotinamidei + ATP = NAD^+ + pirofosfat anorg.

Toate componentele codehidrazelor pot fi sintetizate de organismul animal, cu excepția amidei acidului nicotinic, pe care omul și unele animale (câine, porc) nu o pot produce.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dehidrogenazele NAD^+-dependente catalizează dehidrogenarea izocitratului, D-β-hidroxibutiratului, glicerinaldehid-3-fosfatului, dihidro-lipoamidei, L-β-hidroxiacil-CoA, etanolului, lactatului, glicerin-3-fosfatului şi malatului. Dehidrogenaza glucozo-6-fosfatului este $NADP^+$-dependentă, în timp ce L-glutamat dehidrogenaza acceptă atât NAD^+ cât şi $NADP^+$ drept grupare prostetică.

NAD^+ şi $NADP^+$, în reacţiile enzimatice, fixează hidrogenul cedat de substrat trecând în *formele reduse*. Acestea cedează mai departe hidrogenul unor acceptori, printre care se numără sistemul enzimatic al diaforazei, regenerând codehidrazele respective.

Un exemplu de reacţie catalizată de o dehidrogenază dependentă de piridinnucleotide îl reprezintă oxidarea acidului malic la acid oxalilacetic sub influenţa *malat-dehidrogenazei*. Reacţia reprezintă o etapă importantă în oxidarea biologică a zaharurilor. Malat-dehidrogenaza din ficat funcţionează cu NAD^+ drept coenzimă, nu şi cu $NADP^+$. Alte piridinnucleotide leagă în mod specific $NADP^+$. Un exemplu în acest sens este şi *glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza*. Pe de altă parte însă, glutamat-dehidrogenaza poate folosi drept coenzimă atât NAD^+ cât şi $NADP^+$.

Transferul de hidrogen de la substrat (AH_2) la codehidrază s-ar putea realiza astfel: un ion de hidrură ($H:^-$) s-ar fixa în poziţia 4 a inelului piridinic, iar un proton ar trece în soluţie sub formă de H_3O^+. La regenerarea codehidrazei, ionul de hidrură ar fi cedat unui alt acceptor, care fixează simultan şi un proton din soluţie. În total s-ar transfera deci doi atomi de hidrogen (fig. 1.12). Nu se cunoaşte mecanismul precis al transferul ionului de hidrură, deoarece, în

absența enzimei, coenzima sau compușii înrudiți nu reacționează după schema aceasta.

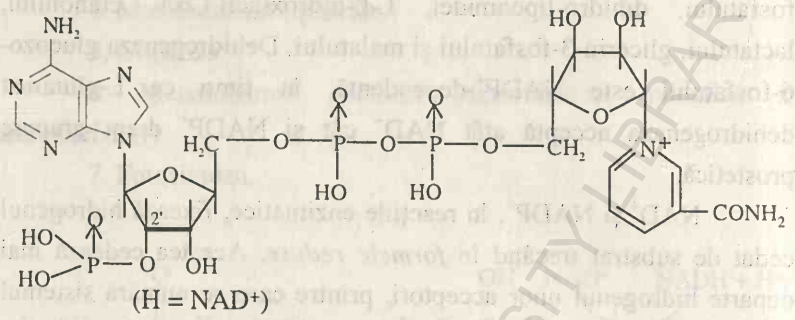


Fig 1.10. $NADP^+$ (Codehidraza II)

Reacția de dehidrogenare are loc de fapt printr-un transfer direct de atomi de hidrogen de la o moleculă la alta; dacă ar fi avut loc un transfer de electroni, ar fi urmat formarea ionilor de hidrogen, care ar fi ajuns sau nu pe restul de nicotinamidă. Acest mecanism a fost stabilit cu CH_3CD_2OH ca substrat.

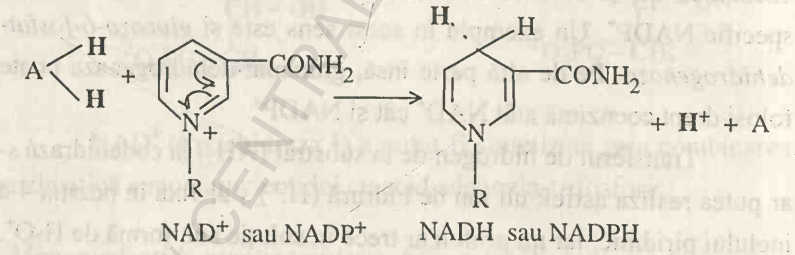
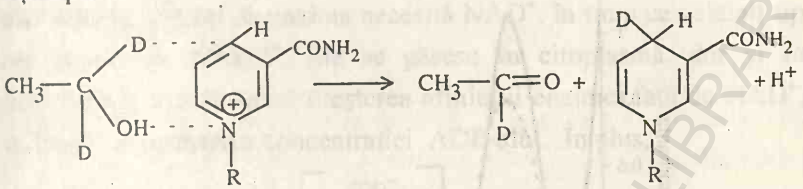


Fig. 1.11. Reducerea ciclului piridinic de catre substrat (AH_2)

În timpul reacției orientarea relativă a substratului și coenzimei este întotdeauna aceeași. Atomul de hidrogen este transferat numai atomului C_4 din nucleul coenzimei, iar hidrogenul hidroxilic este transferat azotului.

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reacția este stereochimic specifică, având loc numai pe o față a planului inelului.



Spectrul de absorbție în ultraviolet a codehidrazelor prezintă o bandă intensă la 260 nm; în spectrul hidrocodehidrazelor, această bandă este atenuată, dar apare în schimb o bandă nouă, de mai mică intensitate, la 340 nm (fig. 1.12).

Spre deosebire de coenzimele flavinice (FMN şi FAD), coenzimele piridinice (NAD^+ şi $NADP^+$) pot exista liber în celulă, disociate de partea proteică. NAD^+ participă în special în lanțul transportorilor de hidrogen, iar $NADP^+$ mai ales în reacțiile de sinteză reductivă (acizi graşi şi proteine).

Carența în vitamina PP se manifestă prin pelagră (pella-agra = piele aspră, brună).

Pelagra se instalează când dieta este constituită în exclusivitate din porumb, sărac în triptofan şi vitamina B_6. Semnele pelagrei sunt: oboseala, slăbiciunea, indigestia, anorexia, urmate după câteva luni de dermatită (mai ales pielea expusă la soare), diaree şi demență (boala celor 3D).

Dereglările metabolice din pelagră sunt greu de definit deoarece carența de vitamină PP poate fi indusă de carența altor vitamine, în special B_6, în lipsa căreia nu se mai sintetizează vitamina PP din triptofan.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

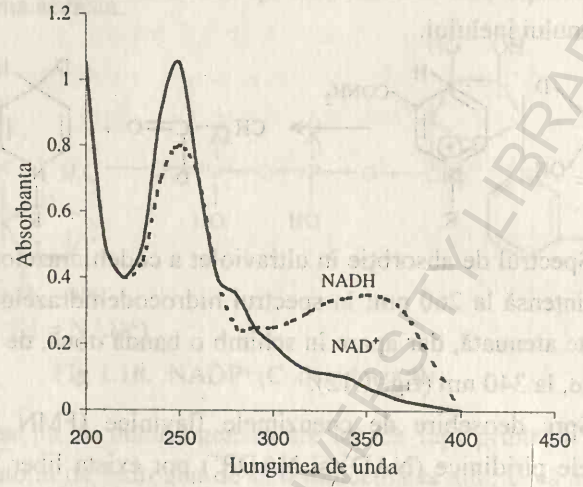


Fig. 1.12. Absorbtia optica a NAD^+ si $NADP^+$

Nicotinamiddinucleotida participă de asemenea, împreună cu coenzima A, la formarea acetilcoenzimei A. Aceasta este folosită în continuare la formarea acidului citric (fig. 1.13).

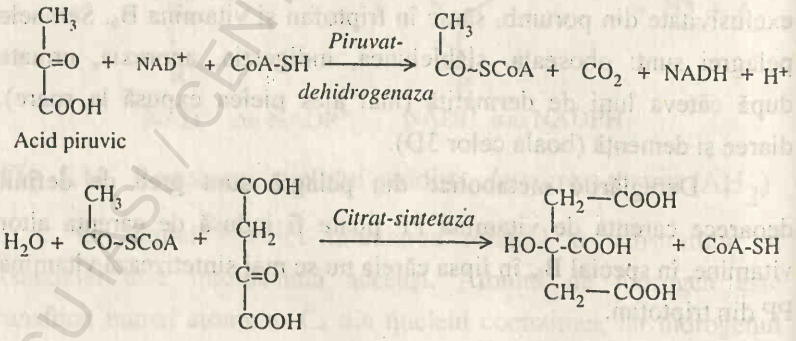


Fig. 1.13. Participarea NAD la sinteza acidului citric

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Oxidarea acidului izocitric la acid α-cetoglutaric necesită de asemenea NAD^+. Există de fapt două izocitrat dehidrogenaze şi nu una singură. Un tip de enzima necesită NAD^+, în timp ce celălalt tip are nevoie de $NADP^+$. Ele se găsesc în citoplasmă, dar şi în mitocondrii. S-a observat creşterea afinităţii enzimei faţă de NAD^+, în funcţie de creşterea concentraţiei ADP-ului. În plus,

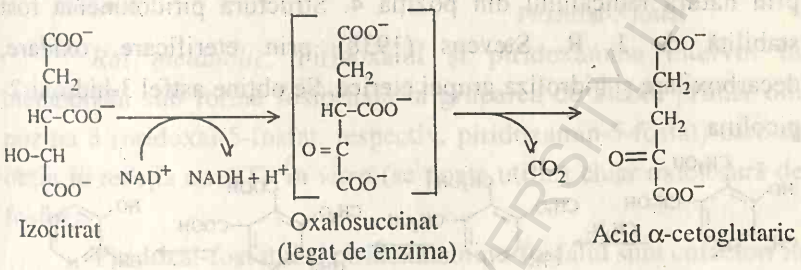
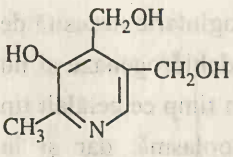


Fig. 1.14. Reactia izocitratului cu producere de NADH

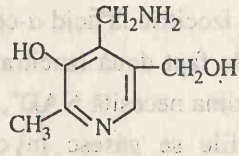
enzima este inhibată de ATP şi de NADH. Astfel, aceasta este un exemplu de enzimă alosterică, fiind influenţată de concentraţia altor compuşi, decât produşii săi. Şi cealaltă enzimă poate dehidrogena izocitratul; aceasta nu este însă alosterică, deci nu poate fi afectată de către concentraţiile ATP şi NADH. Aşadar, creşterea concentraţiei ADP în celulă, ca urmare a descompunerii ATP, va creşte viteza de oxidare a izocitratului, cu formare de NADH. Creşterea concentraţiei acesteia, conduce implicit la oprirea oxidării izocitratului (fig. 1.14).

Vitamina B_6

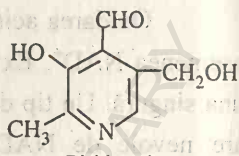
Vitamina B_6 (piridoxina, adermina) include trei compuşi naturali, piridoxina,



Piridoxina

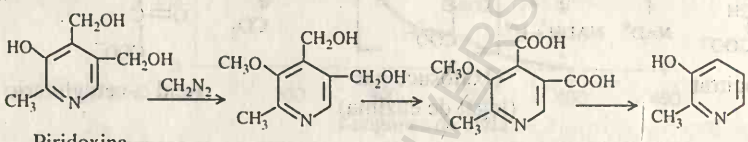


Piridoxamina



Piridoxal

piridoxamina şi piridoxalul, derivaţi ai piridinei, care se deosebesc prin natura radicalului din poziţia 4. Structura piridoxinei a fost stabilită de J. R. Stevens (1938) prin eterificare, oxidare, decarboxilare şi hidroliza grupei eterice. Se obţine astfel 3-hidroxi-2-picolina.

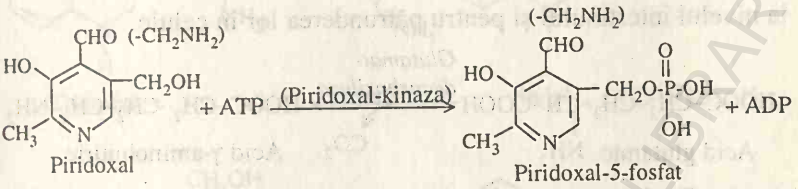


Piridoxina

3-Hidroxi-2-picolina

Cele două grupe CH_2OH sunt vicinale, deoarece acidul dicarboxilic obţinut prin oxidarea lor dă prin condensare cu rezorcină şi $ZnCl_2$ un colorant de tipul fluoresceinei. Piridoxina este deci 2-metil-3-hidroxi-4,5-di-(hidroximetil)-piridina. Cele trei forme ale vitaminei B_6 sunt distruse de agenţii oxidanţi (H_2O_2, $KMnO_4$, HNO_3) şi de radiaţiile ultraviolete. Experienţele lui Snell şi a colaboratorilor săi au arătat că piridoxalul reacţionează chiar neenzimatic cu acidul glutamic la 100°C pentru a produce piridoxamină şi acid α-ceto-glutaric. Aşadar, grupa aldehidică a piridoxalului reacţionează cu grupele amino pentru a forma baze Schiff. Grupele amino se detaşează apoi de pe aminoacid, cu formare de cetoacizi. Grupa OH fenolică din poziţia 3 accentuează capacitatea piridoxalului de a reacţiona cu grupele amino, formând un ciclu stabilizat în care intervine şi protonul acestei grupe fenolice. În organism, piridoxal-5-

fosfatul şi piridoxamin-5-fosfatul îndeplinesc rolul de grupări prostetice.



Piridoxal

Piridoxal-5-fosfat

Rol metabolic. Piridoxalul şi piridoxamina intervin în metabolism sub formă fosforilată la gruparea de alcool primar din poziţia 5 (pridoxal-5-fosfat, respectiv, piridoxamin-5-fosfat) care se obţin în reacţia cu ATP *in vitro* (se poate utiliza chiar oxiclorură de fosfor).

Piridoxal-fosfatul şi piridoxalamino-fosfatul sunt cofactori în special în enzimele ce catalizează transferul grupărilor aminice. Printre enzimele ce necesită piridoxal fosfat sa află şi:

1. *Decarboxilazele aminoacizilor.*

2. *Transaminazele.* Dintre acestea, numai cele dintre glutamat şi piruvat cu formarea alaninei şi dintre glutamat şi oxaloacetat cu formarea aspartatului sunt reversibile.

3. *Racemazele.* Ele catalizează formarea DL-alaninei din D- sau L-alanină.

4. Enzime implicate în metabolismul triptofanului:
- *triptofanaza*, converteşte triptofanul în indol;
- enzimele ce convertesc kinurenina în acid antranilic;
- sintetazele triptofanului din indol şi serină.

5. *Cistationazele*, implicate în conversia cistationinei la serină şi homocisteină.

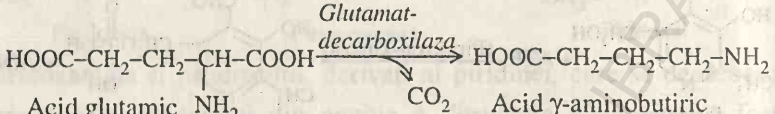
6. Dezaminaze (pentru serină şi treonină).

7. Transsulfurazele (care transferă sulful de la metionină la serină, pentru sinteza cisteinei).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

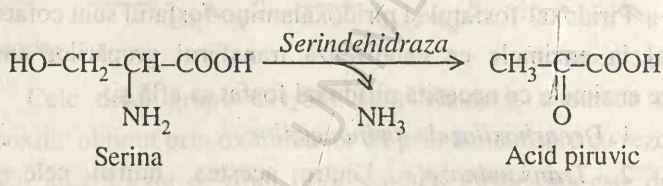
8. Desulfurazele (substat cisteina sau homocisteina).

Există şi enzime cu rol important în absorbţia aminoacizilor la nivelul intestinului şi pentru pătrunderea lor în celule.



Fosfopiridoxalul este coenzima decarboxilazelor tirozinei, argininei şi acidului glutamic, care determină formarea aminelor cu activitate biologică.

Treonina, serina şi alţi aminoacizi sunt dezaminaţi în prezenţa aceluiaşi fosfopiridoxal:



În metabolismul triptofanului, triptofan sintaza şi triptofanaza, care conţin în calitate de coenzimă fosfopiridoxal, catalizează reacţiile următoare (fig. 1.15).

Piridoxal-5-fosfatul se leagă printr-un sistem de baze Schiff cu gruparea ε-amino a unui reziduu lizinic din apoenzimă. În timpul formării complexului enzimă-substrat, această grupare este eliberată. Numai piridoxalul îndeplineşte funcţii de coenzimă. Piridoxina şi piridoxamina sunt mai întâi convertite în piridoxal-fosfat. În calitate de coenzimă a aminotransferazelor, vitamina B_6 este prezentă sub formă de fosfopiridoxamină (fig. 1.16).

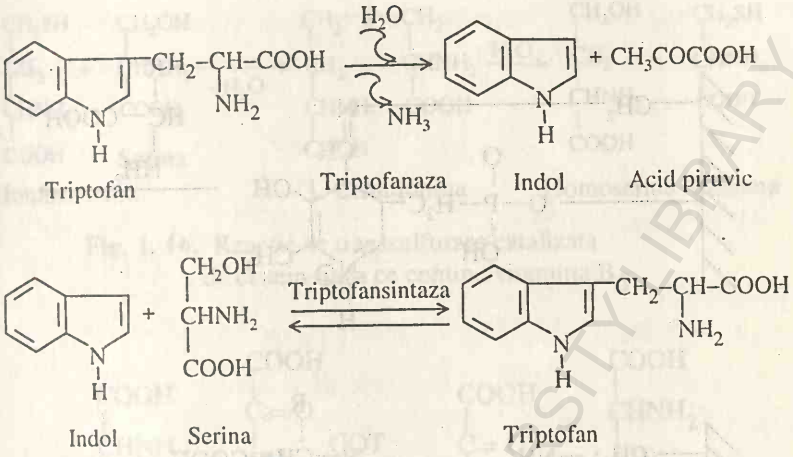


Fig. 1.15. Actiunea triptofan sintazei

Cistein liaza este o enzimă care conține fosfopiridoxal şi transferă gruparea –SH, realizând astfel o transsulfurare (fig. 1.17).

Funcția principală a vitaminei B_6 (sub formă de fosfopiridoxamină) este aceea de coenzimă a aminotransferazelor, enzime care transportă grupa NH_2 de la un substrat la altul. Se cunosc 19 aminotransferaze, dintre care cele mai studiate sunt *L-aspartat: 2-oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.1.1) sau GOT şi *L-alanin: 2-oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.1.2) sau GPT, care catalizează următoarele reacții (fig. 1.18 şi fig. 1.19).

Caşexia reprezintă o suită de modificări metabolice care apare în cancer, diabet sau în înfometare. Simptomele sale sunt scăderea excesivă în greutate, degradarea marcată a proteinelor şi lipidelor tisulare, anemie şi balanță negativă de azot. Una din modificările hepatice importante o constituie reducerea activității *alanin-amino transferazei*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

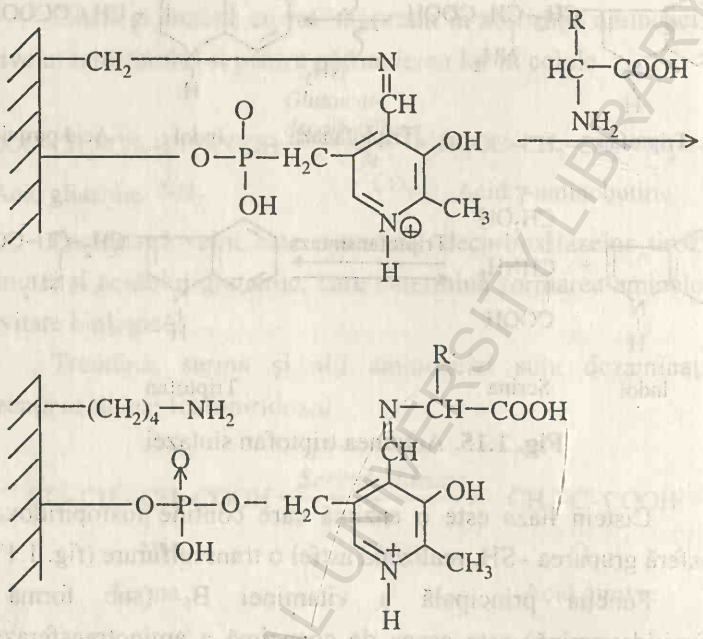


Fig. 1.12. Legarea piridoxal-5-fosfatului
la apoenzima aminotransferazelor

In sânge apar concenntrații mari de alanină provenită din mușchi, dependentă la rândul ei de intensitatea oxidării în țesutul muscular a aminoacizilor ramificați. Gluconeogeneza se realizează pe seama lactatului și glicerolului și nu pe lanțurile de carbon ale aminoacizilor glucogenici. În același timp, este suprimată oxidarea acizilor grași cu catene lungi, precum și formarea de corpi cetonici care par să regleze oxidarea aminoacizilor ramificați în țesutul muscular.

Fig. 1. 16. Reactie de transsulfurare catalizata de cistein-liaza ce contine vitamina B_6

Fig. 1. 17. Reactie de transaminare catalizata de L-aspartat aminotransferaza

Fig. 1. 18. Reactie de transaminare catalizata de L-alanin: 2-oxoglutarat aminotransferaza

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina B_6 intervine, de asemenea, într-o reacție deosebit de importantă, catalizată de *alanin cetoacid aminotransferază* (fig. 1.19).

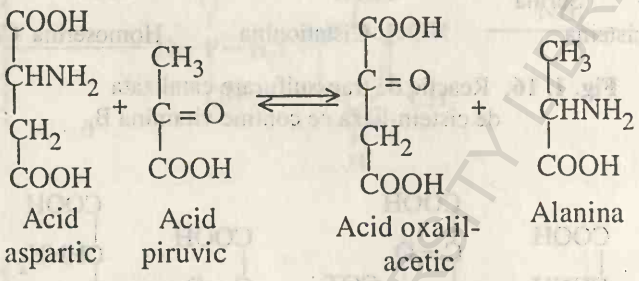
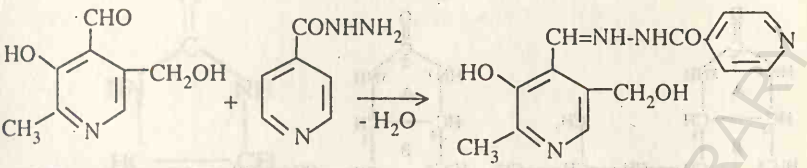


Fig. 1. 19. Reactie de transaminare catalizata de *alanin cetoacid aminotransferaza*

Se observă ușor că aceste reacții sunt de echilibru, iar un exces de acid piruvic, care poate proveni la rândul său din acidul lactic, poate deplasa echilibrul spre formarea de alanină. Este foarte probabil ca, în mediu ușor acid, datorat glicolizei cu formare de acid lactic, să crească activitatea proteazelor care scindează proteinele în aminoacizii componenți, iar alanina constituie un produs final cheie al întregului proces.

Tulburările de aport vitaminic conduc la stări de nervozitate, insomnie, tulburări de mers, afecțiuni cutanate în jurul nasului, ochilor, gurii, limfocitopenie, edeme. Aceste tulburări ale pielii seamănă cu pelagra, însă nu se pot vindeca cu acid nicotinic.

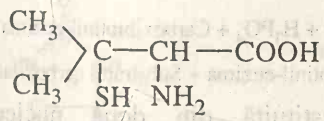
Medicația cu hidrazida acidului izonicotinic (ISONIAZID) în tuberculoză inhibă enzimele ce conțin piridoxal-5-fosfat. Pacienții dezvoltă o neuropatie periferică, ce răspune foarte bine la terapia cu B_6.



Piridoxal (Vitamina B_6) Izoniazida Piridoxal-hidrazona

Carența în vitamina B_6 favorizează apariția cariilor dentare, conduce la modificări în metabolismul triptofanului. Vitamina B_6 se găseşte în cantitate mare în semințele cerealelor.

Penicilamina (β-dimetil-cisteina) aplicată curent în artrita reumatoidă şi cistinurie, reacționează cu B_6 pentru a conduce la un derivat



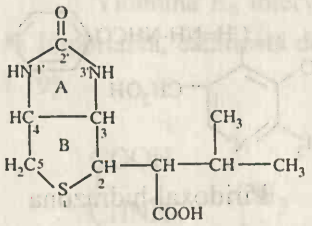
Penicilamina

tiazolidinic inactiv. Pacienții prezintă uneori convulsii, care pot fi prevenite prin tratament cu piridoxină.

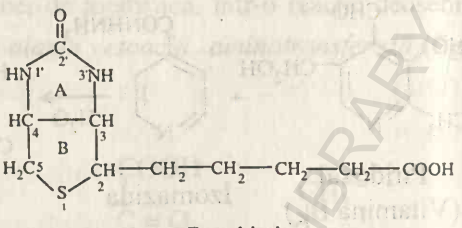
Vitamina B_7

Vitamina B_7 (biotina, vitamina H) este indispensabilă înmulțirii drojdiilor şi a altor microorganisme. Ea controlează diviziunea celulară. Este necesară funcționării normale a pielii (vitamina H). A fost izolată în stare cristalină de Kögl (1936) din gălbenuş de ou, apoi din ficat de către Vigneaud, care i-a determinat structura.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Alfa-biotina



Beta-biotina

Albuşul de ou conţine o proteină, avidina, care leagă puternic biotina şi aceasta nu mai poate fi absorbită la nivelul intestinului, iar animalele hrănite cu albuş se îmbolnăvesc. Lane şi Lynen au arătat că această vitamină este importantă pentru transferul şi încorporarea bioxidului de carbon, fiind grupa prostetică a *propionol-CoA carboxilazei*.

$$ATP + HCO_3^- + \text{Biotinil-enzima} \rightleftarrows ADP + H_3PO_4 + \text{Carboxibiotinil-enzima}$$

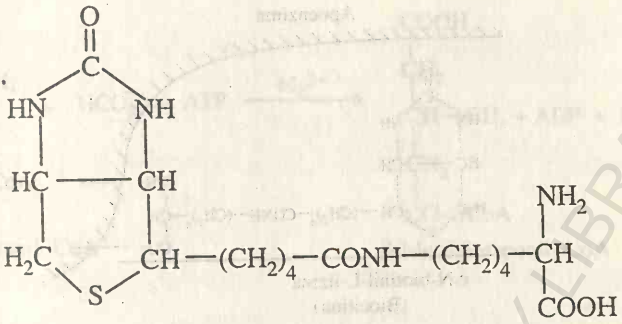
$$\text{Carboxibiotinil-enzima} + \text{Substratul} \rightleftarrows \text{Biotinil-enzima} + \text{Substratul carboxilat}$$

Molecula biotinei este constituită din două nuclee condensate, un nucleu tetrahidro-imidazolic (A) şi unul tetrahidro-tiofenic (B), la care este grefată o catenă laterală de acid n-valerianic. Se cunosc doi izomeri naturali, alfa şi beta-biotina, izolaţi din ficat şi lapte, respectiv din gălbenuşul de ou.

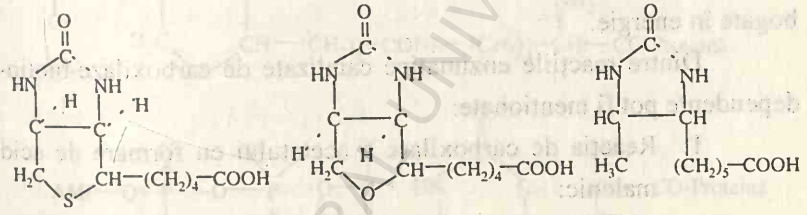
Biotina se află în gălbenuşul de ou legată de proteină prin intermediul unui rest de lizină.

Biocitinaza, enzimă prezentă în plasmă, ficat, pancreas, hidrolizează biocitina, eliberând biotina. În produsele naturale apare combinată cu lizina, sub formă de biocitină:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Sunt mai multe forme biotinice active: biotina, activă numai sub forma izomerului (+), oxibiotina, care are atomul de sulf înlocuit cu unul de oxigen şi, pentru unele microorganisme, destiobiotina.

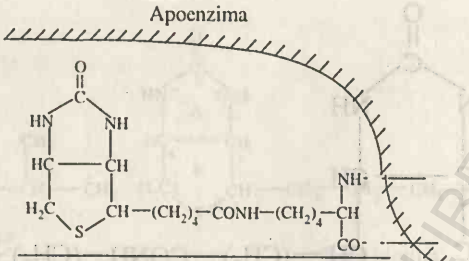


Biotina (epibiotina) Oxibiotina (cis) Destiobiotina

Fig. 1.20. Biotina si antivitaminele sale

Rol metabolic. Biotina este cofactorul reacţiilor enzimatice în care are loc o activare, urmată de un transfer de CO_2, participând astfel la reacţiile de carboxilare şi decarboxilare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

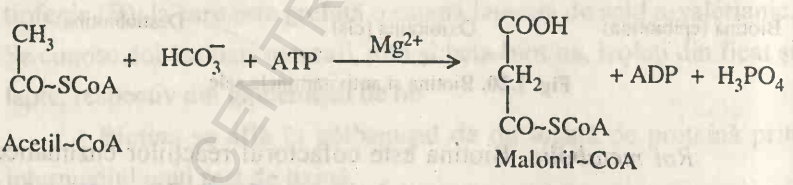


În reacțiile de carboxilare, CO_2 activat de către ATP, participă sub formă de carboxi-biotin-enzimă (fig. 1.21).

Formarea complexului macroergic dintre CO_2 și biotină, cu ΔE^{01} = -4,74 kcal/mol, arată că biotinil enzimele sunt substanțe bogate în energie.

Dintre reacțiile enzimatice catalizate de carboxilaze-biotin-dependente pot fi menționate:

1. Reacția de carboxilare a acetatului cu formare de acid malonic:



Acetil~CoA

Malonil~CoA

Reacția este catalizată de acetil-CoA-carboxilaza. Este prima treaptă din sinteza acizilor grași. Adăugarea de malonil-CoA la acetil-CoA determină creșterea lungimii lanțului acidului gras sintetizat.

2. Reacția de carboxilare catalizată de enzima β-metilcrotonil-CoA-carboxilază:

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

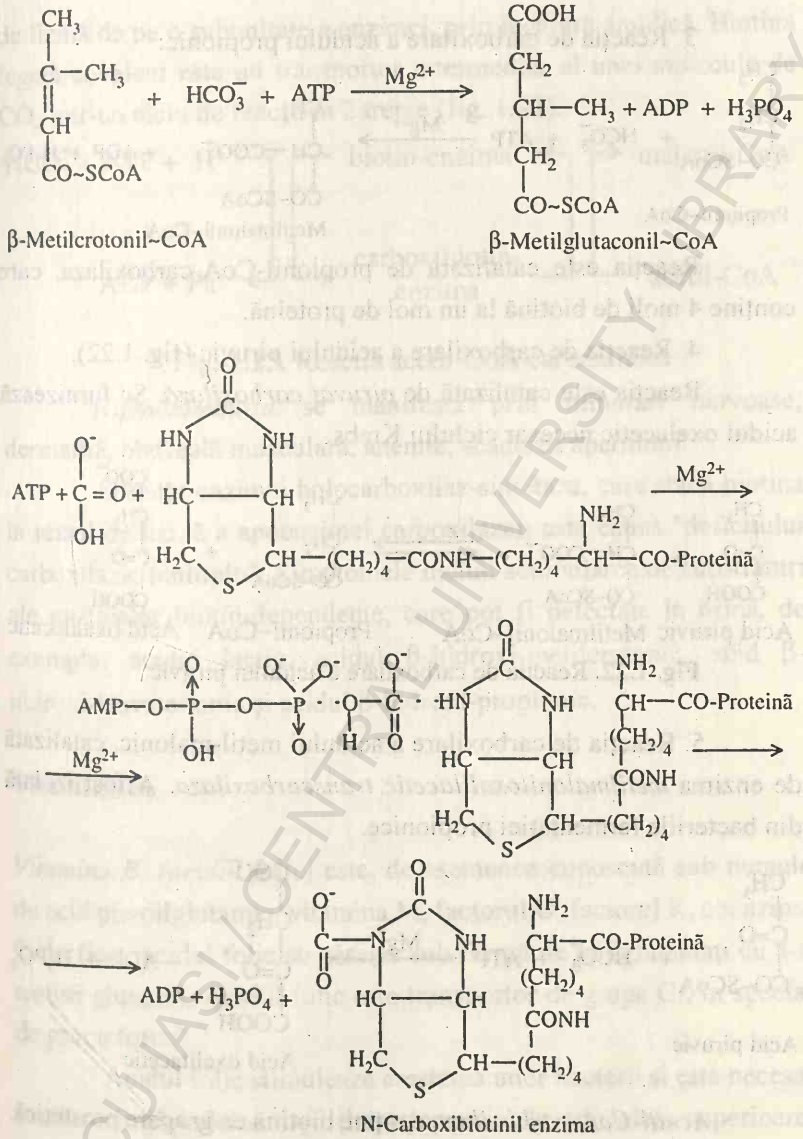
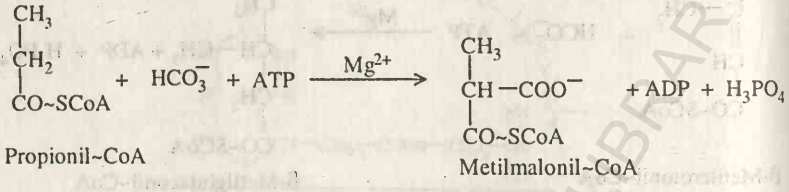


Fig. 1.21. Formarea carboxibiotinil-enzimei

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Reacția de carboxilare a acidului propionic:



Reacția este catalizată de propionil-CoA-carboxilaza, care conține 4 moli de biotină la un mol de proteină.

4. Reacția de carboxilare a acidului piruvic (fig. 1.22).

Reacția este catalizată de *piruvat carboxilază.* Se furnizează acidul oxalacetic necesar ciclului Krebs.

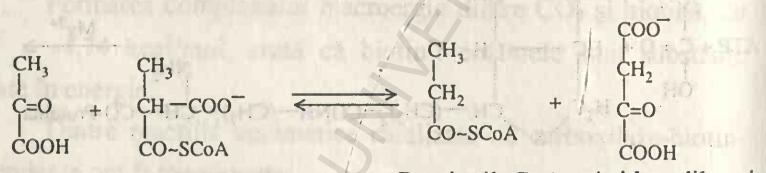
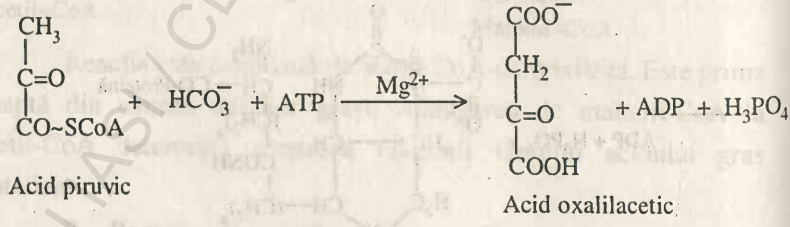


Fig. 1.22. Reactia de carboxilare a acidului piruvic

5. Reacția de carboxilare a acidului metil-malonic, catalizată de enzima *metilmaloniloxalilacetic transcarboxilaza.* A fost izolată din bacteriile fermentației propionice.



Acetil-CoA-carboxilaza conține biotină ca grupare prostetică. Gruparea carboxil a biotinei este legată de gruparea ε-NH_2 a unui rest

BCU ASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de lizină de pe o subunitate a enzimei, prin legătură amidică. Biotina legată covalent este un transportor intermediar al unei molecule de CO_2 într-un ciclu de reacții în 2 trepte (fig. 1.23).

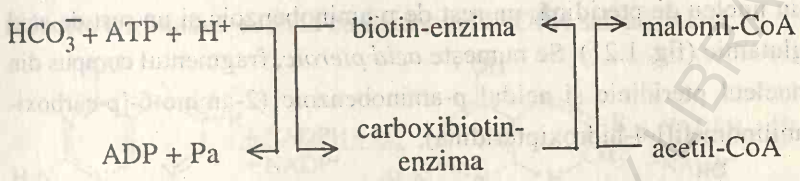


Fig. 1.23. Reactia acetil-CoA carboxilazei

Hipovitaminoza se manifestă prin tulburări nervoase, dermatită, oboseală musculară, anemie, scăderea apetitului.

Absența enzimei holocarboxilaz-sintetaza, care atacă biotina la restul de lizină a apoenzimei carboxilazei, este cauza "deficitului carboxilazic multiplu". Simptomele includ acumularea de substraturi ale enzimelor biotin-dependente, care pot fi detectate în urină, de exemplu: acidul lactic, acidul β-hidroxi-metilcrotonic, acid β-hidroxi-izovalerianic şi acidul β-hidroxi-propionic.

Vitamina B_9

Vitamina B_9 (acidul folic) este, de asemenea cunoscută sub numele de acid pteroilglutamic, vitamina M, factorul U, factorul R, coenzima C. În ficat, acidul folic se găseşte sub formă de poliglutamați cu 4-6 resturi glutamil. Acidul folic este transportor de grupe C_1, în special de grupe formil.

Acidul folic stimulează creşterea unor bacterii şi este necesar producerii globulelor roşii (hematopoesis) la animalele superioare; lipsa sa provoacă anemie la animalele experimentale. Structura

acidului folic a fost stabilită prin degradare şi sinteză (Angier şi colab., 1946).

Molecula acidului folic se compune din trei părţi distincte: un nucleu de pteridină, un rest de p-aminobenzoic şi un rest de acid glutamic (fig. 1.21). Se numeşte *acid pteroic*, fragmentul compus din nucleul pteridinic şi acidul p-aminobenzoic (2-amino-6-[p-carboxi-anilinometil]-4-hidroxipteridina).

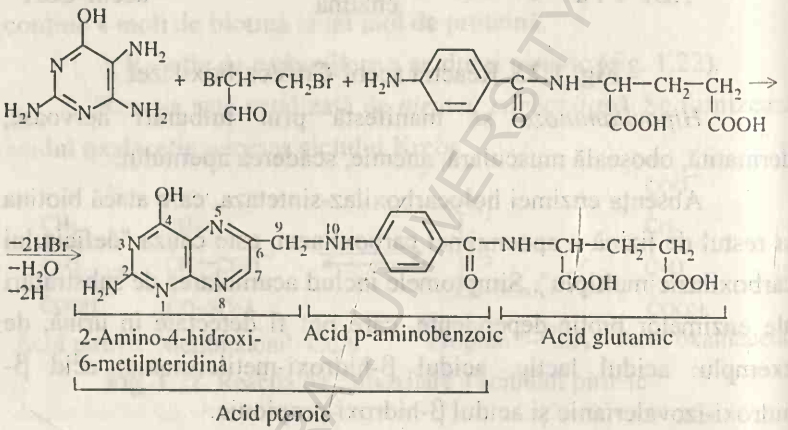


Fig. 1.24. Acid pteroilglutamic (acid folic)

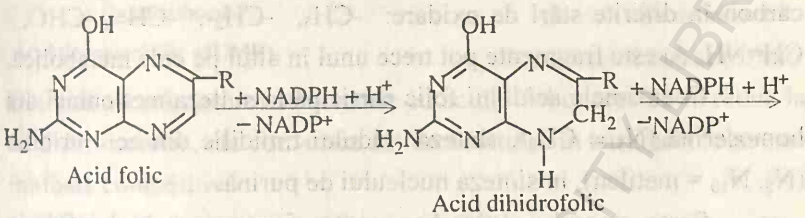
Sinteza acidului folic, numit şi acid pteroilglutamic, a fost efectuată prin condensarea simultană a trei componente în soluţie apoasă, la un pH apropiat de neutru (2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidina, dibromura acroleinei şi acidul p-aminobenzoil-glutamic).

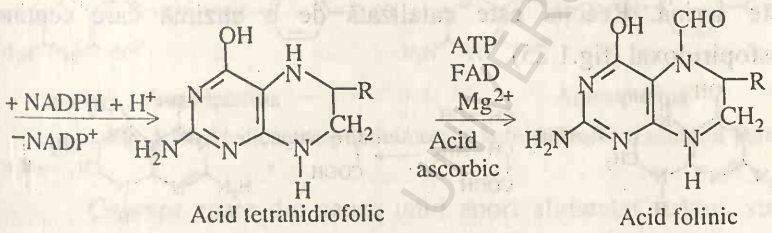
Sub influenţa NADPH, acidul folic se reduce enzimatic la acidul dihidrofolic şi, mai departe, la acidul tetrahidrofolic, notat cu FH_4.

Acidul folinic se formează din acidul tetrahidrofolic prin legarea în N_5 a grupei formil. Acidul folinic este indispensabil pentru

diviziunea celulelor din organismul mamiferelor. Acest acid se mai numeşte acid tetrahidrofolic (FH_4) sau formaldehidă activă.

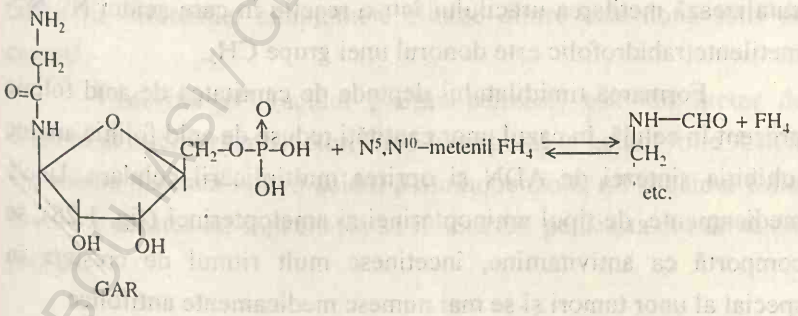
Acidul tetrahidrofolic se obţine din acid dihidrofolic prin reducere enzimatică cuplată cu oxidarea NADPH sau a NADH.





Derivaţii acidului tetrahidrofolic funcţionează ca donori de grupări cu un singur atom de carbon în reacţiile enzimatice.

1.N^5,N^{10}-Anhidroformil FH_4 donează gruparea CHO glicinamid-ribotidei (GAR) cu formarea formilglicinamid-ribotidei (FGAR) în procesul biosintezei purinei:



BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. N^{10}-Formil FH^4 este implicat în conversia 4-amino-5-imidazol-carboxamid-ribotidei la derivatul sau formilat.

Rol metabolic. Acidul folic şi derivaţii săi îndeplinesc în organism rolul de coenzime care participă la transferul unui atom de carbon în diferite stări de oxidare: $-CH_3$, $-CH_2-$, -CH=, -CHO, -CH=NH. Aceste fragmente pot trece unul în altul pe cale metabolică.

Coenzimele acidului folic participă la sinteza metioninei din homoserină (N_5 = CH_3), sinteza acidului timidilic din acid uridilic (N_5, N_{10} = metilen), în sinteza nucleului de purină.

Sursa atomului de carbon pentru formarea acidului folinic este serina. Reacţia este catalizată de o enzimă care conţine fosfopiridoxal (fig.1.25).

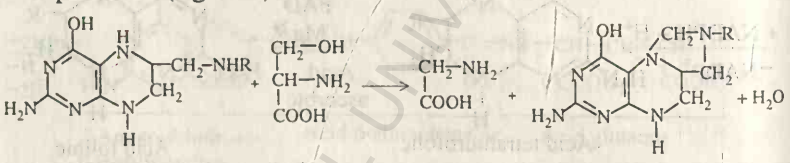
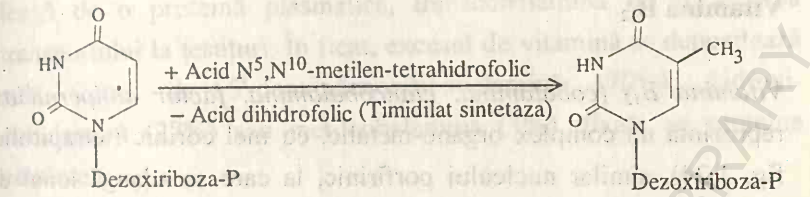


Fig. 1.25. Biosinteza acidului folinic

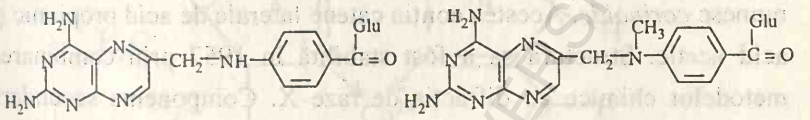
ADN conţine timină (5-metiluracil) în loc de uracil, care este prezent în ARN. Acidul dezoxitimidilic (dTMP) este format din acid dezoxiuridilic (dUMP) cu ajutorul timidilat sintetazei, care catalizează metilarea uracilului într-o reacţie în care acidul N^5, N^{10}-metilentetrahidrofolic este donorul unei grupe CH_3.

Formarea timidilatului depinde de cantitatea de acid folinic prezent în celulă. În cazul unor cantităţi reduse de acid folinic are loc inhibiţia sintezei de ADN şi oprirea multiplicării celulare. Unele medicamente, de tipul aminopterinei şi ametopterinei (fig. 1.26), se comportă ca antivitamine, încetinesc mult ritmul de creştere în special al unor tumori şi se mai numesc medicamente antifolice.



Acid dezoxiuridilic (dUMP) Acid dezoxitimidilic (dTMP)

Datorită asemănării lor structurale cu acidul folic, acestea se reduc la acid dihidrofolic, dar conversia dihidrofolatului în tetrahidrofolat este inhibată competitiv.



Aminopterina Ametopterina

Fig. 1.26. Medicamente antitumorale, antimetaboliti ai acidului folic

Carența apare din cauza unui aport alimentar scăzut, stres (sarcină), tulburări de absorbție, deficit de enzime implicate în sistemul de transport sau terapia cu unele medicamente. Carența se manifestă exclusiv prin perturbarea hematopoiezei, simptomul fiind anemie megaloblastică (cu eritrocite mari şi rare). Datorită relației strânse dintre activitatea acidului folic şi cea a vitaminei B_{12}, este dificil de diferențiat simptomele clinice dintre cele două stări de carență.

Vitamina H' (acidul p-aminobenzoic) este un factor de creştere al microorganismelor, fiind încorporat în acidul folic. Unele organisme necesită numai acidul p-aminobenzoic, nu şi acidul folic, deoarece acestea au capacitatea să sintetizeze pe acesta din urmă din primul.

Vitamina B_{12}

Vitamina B_{12} (cobalamina, ciancobalamina, factor antipernicios) reprezintă un complex organo-metalic, cu inel corinic (tetrapirolic, fig. 1.24), similar nucleului porfirinic, la care se adaugă ionul de cobalt. Metalul este legat strâns, încât nu poate fi eliminat fără distrugerea moleculelor.

Vitamina B_{12} derivă de la un sistem macrociclic numit *corină*, care conține patru atomi de azot. Derivații acestui compus se numesc *corinoide*. Acestea conțin catene laterale de acid propionic și acid acetic. Structura sa a fost stabilită în 1957 prin combinarea metodelor chimice cu difracția de raze X. Componenta secundară majoră a vitaminei B_{12} este o ribonucleotidă care are ca baza 5,6-dimetilbenzimidazolul care este legată atipic de D-riboză printr-o legătură α-N-glicozil și nu o legătură β-glicozidică cum se întâmplă cu cele mai multe nucleotide. Această nucleotidă este direct legată de nucleul corinic prin atomul de cobalt.

A fost izolată din extract de ficat (Folkers, 1948; Smith, 1960) dar este produsă de multe bacterii și actinomicete. Se prezintă sub formă de cristale roșii, solubile în apă.

Lipsa vitaminei B_{12} din organism produce anemie pernicioasă, o maladie a sângelui însoțită de tulburări nervoase. În țesuturile animale este conjugată cu polipeptide. Injectată, restabilește numărul de celule roșii și reface sistemul nervos central în anemia pernicioasă.

Absorbția intestinală a vitaminei B_{12} se face mediat de o glicoproteină foarte specifică, numită "factor intrinsec", secretat de celulele parietale ale mucoasei gastrice. După absorbție, vitamina se

leagă de o proteină plasmatică, transcobalamina II, în vederea transportului la țesuturi. În ficat, excesul de vitamină se depozitează sub formă de 5'-deoxiadenozil-cobalamină (70%), hidroxi-cobalamină (27%) sau metilcobalamină (3%), fixate pe proteine celulare.

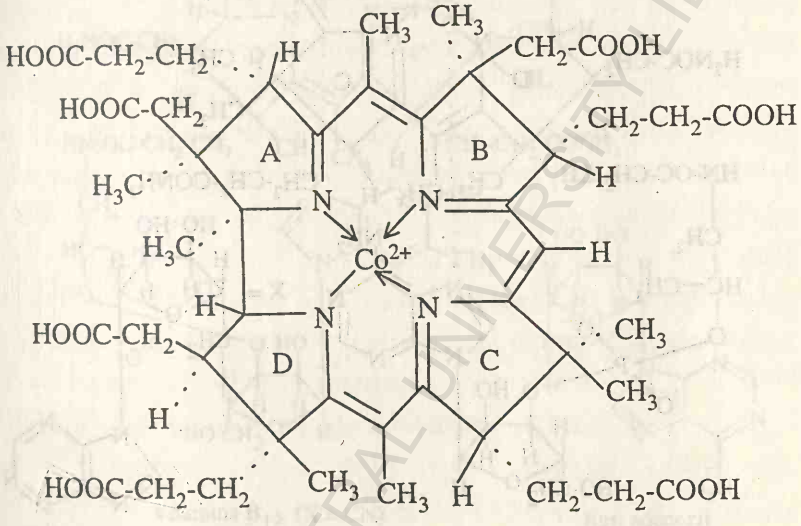


Fig. 1.27. Acidul cobirinic

Vitamina B_{12} este o substanță de culoare roșu închis conținând un atom de cobalt legat coordinativ de cei patru atomi de azot din tetrapirolul parțial hidrogenat.

În vitamina B_{12} șase din carbonilii acidului cobirinic sunt amidificați ca grupe $CONH_2$, iar al șaptelea este amidificat cu grupa NH_2 din D(—)aminopropanol ($H_2NCH_2CH(OH)CH_3$). Grupa OH din acest alcool este legată, prin intermediul unui rest de acid fosforic, de

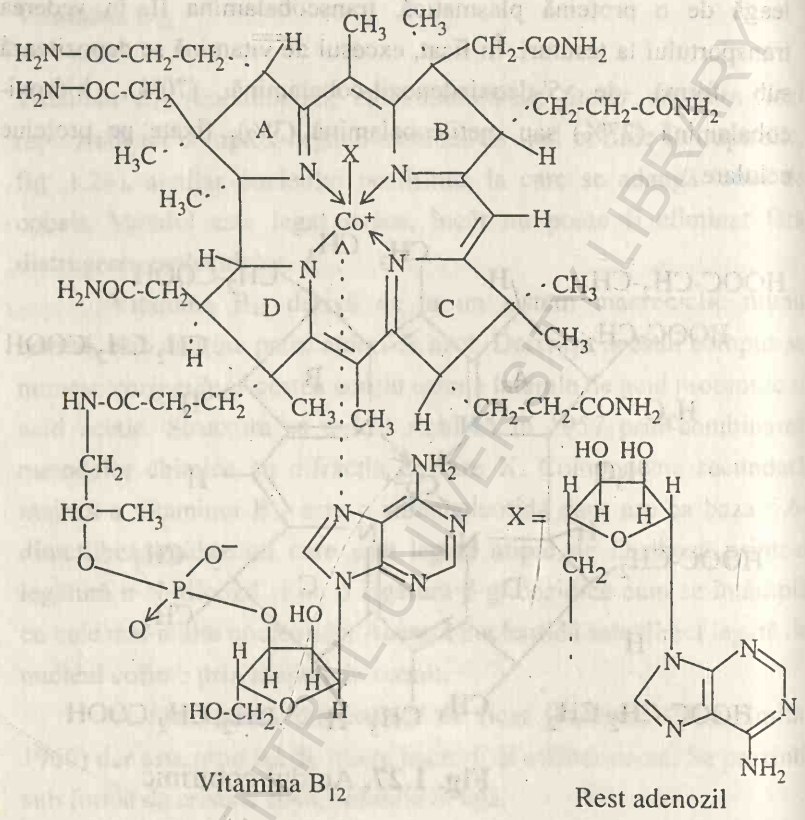


Fig. 1.28. Adenilcobamida

N-glicozida 5,6-dimetil-benzimidazolului. Al doilea atom de azot al inelului imidazolic este coordinat cu cobaltul; a şasea poziţie coordinativă a cobaltului (octaedric) este legată de o grupă cian. Structura vitaminei B_{12} a fost stabilită prin analiza cristalografică cu raze X (Crowfoot-Hodkin, 1955). Din *Clostridium tetanomorfum* a fost izolată adenilcobamida (fig. 1.28).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

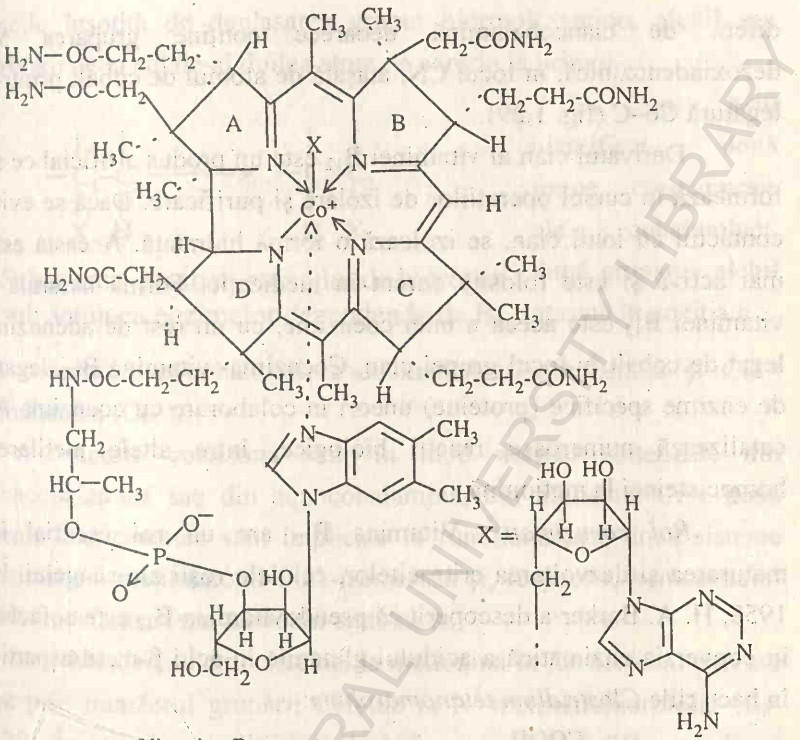


Fig. 1.29 Structura coenzimei benzimidazol–B_{12}

Vitamina B_{12} pătrunde în celulă sub formă de HO-cobalamină, metilându-se apoi la CH_3-cobalamină. O cantitate importantă intră în mitocondrii şi se transformă în 5'-deoxiadenozil-cobalamină.

Sinteza totală a vitaminei B_{12}, care a durat mulţi ani, a fost realizată de Woodward şi Eschenmoser în 1972.

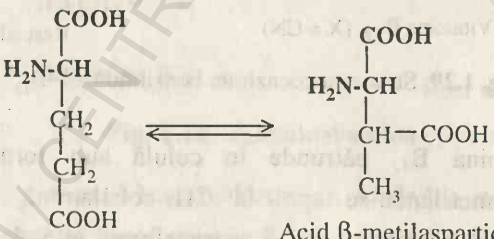
Din ficatul animalelor şi din bacterii a fost izolată o altă coenzimă cobamidică conţinând 5,6-dimetilbenzimidazol. Coenzima

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

diferă de ciancobalamină deoarece conține gruparea 5'-dezoxiadenozinică, în locul CN, atașată de atomul de cobalt printr-o legătură Co–C (fig. 1.29).

Derivatul cian al vitaminei B_{12} este un produs artificial ce se formează în cursul operațiilor de izolare și purificare. Dacă se evită contactul cu ionii cian, se izolează o formă hidratată. Aceasta este mai activă și este folosită curent în medicație. Forma naturală a vitaminei B_{12} este aceea a unei coenzime, cu un rest de adenozină legat de cobalt în locul grupei cian. Coenzima- vitamină B_{12}, legată de enzime specifice (proteine) uneori în colaborare cu coenzima A, catalizează numeroase reacții biologice, între altele metilarea homocisteinei la metionină.

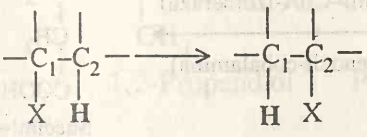
Rol coenzimatic. Vitamina B_{12} are un rol esențial în maturarea și dezvoltarea eritrocitelor, celulele roșii ale sângelui. În 1958, H. A. Barker a descoperit că pseudovitamina B_{12} este cofactor în conversia enzimatică a acidului glutamic în acid β-metil-aspartic în bacterii *Clostridium tetanomorphum*:



Acid glutamic — Acid β-metilaspartic

Pseudovitamina B_{12} conține adenină în loc de 5,6-dimetilbenzimidazol în ribonucleotidă, deoarece *C. tetanomorphum* și alte microorganisme nu pot sintetiza derivatul benzimidazolic, ci adenina. Reacțiile enzimatice care necesită vitamina B_{12} transferă atomul de hidrogen de la un atom de carbon la un altul învecinat,

reacție însoțită de deplasarea grupei hidroxil, amino, alchil sau carboxil de la cel de-al doilea atom de carbon la primul.



Schimarea pozitiei atomului de hidrogen sub actiunea enzimelor dependende de B_1

La om s-au identificat două forme coenzimatice ale cobalaminei, după gruparea alchil ataşată în poziția 6 de coordinare a cobaltului: 5'-deoxiadenozil-cobalamina şi CH_3-cobalamina (Co^+).

Aceste coenzime sunt în mod normal sintetizate din ciancobalamină sau din aquocobalamină, din alimente. Cele două forme coenzimatice sunt implicate în funcționarea a două sisteme enzimatice: metilmalonil-CoA-izomeraza şi, respectiv, homocistein-CH_3-transferaza (sau metionin-sintetaza).

Metilarea homocisteinei la metionină în *Escherichia coli* are loc prin transferul grupării CH_3 de la N^5-metiltetrahidrofolat (fig. 1.30). În anumite condiții, metilcobalamina, în care CH_3 este direct legat de Co, este necesară ca intermediar în transferul grupării metil.

Succinil-CoA este transformat ulterior în acid succinic şi metabolizat în ciclul Krebs.

În absența cobalaminei, prima reacție se blochează, se acumulează N^5-CH_3- FH_4 (FH_4 = acid tetrahidrofolic), deturnând folatul de la rolul său de transportor de grupe "1C", constituind aşa-numita "capcană a folatului sau capcana metilului". Homocisteina rămâne nemetilată şi se elimină prin urină (homocistinurie), iar în al doilea caz se poate acumula şi elimina prin urină acidul L-metil-malonic (acidurie metilmalonică).

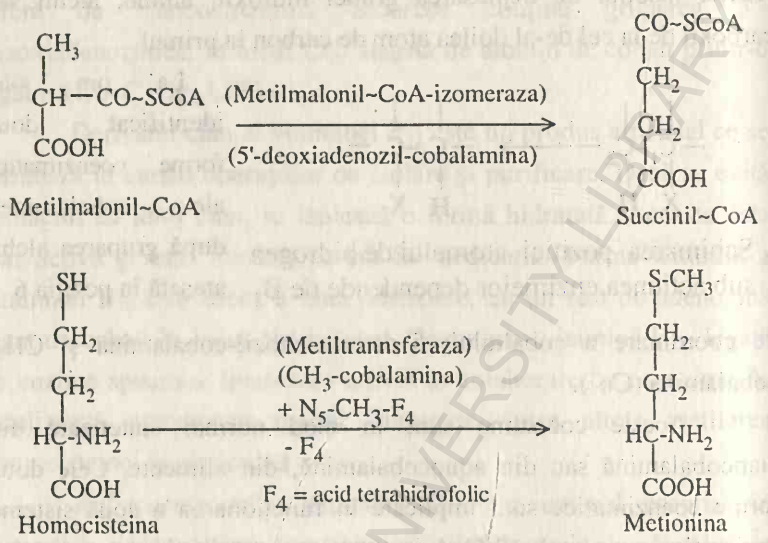


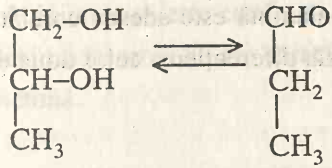
Fig. 1.30. Metilarea homocisteinei la metionina

Totodată, glicol dehidraza, enzimă ce converteşte etilenglicolul la acetaldehidă, necesită o coenzimă cobamidică:

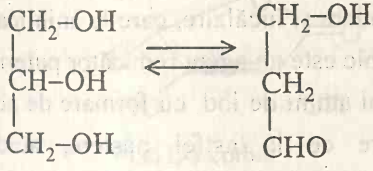
Etilenglicol Acetaldehida

De asemenea, o coenzimă cobamidică permite transformarea 1,2-propandiolului în aldehidă propionică, iar o alta, obţinerea β-hidroxipropionaldehidei din glicerină:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



1,2-Propandiol Propionaldehida



Glicerina β-hidroxi-propionaldehida

Cobalamina şi acidul folic sunt implicate în metilarea histonelor, în timpul replicării ADN-ului. Pe cale neenzimatică, vitamina B_{12} intervine în oxidarea tiolilor.

Tulburări de aport vitaminic. Vitamina B_{12} acţionează în organism ca *factor de creştere* şi ca *factor cu acţiune antipernicioasă*, participând totodată la menţinerea integrităţii celulei nervoase..

Anemia pernicioasă se caracterizează prin eritropoeză megaloblastică, cu modificări ale leucopoiezei şi formării de trombocite.

Alterările hematologice pot fi însoţite de astenie, paloare, dispnee, atrofia mucoaselor digestive, tulburări nervoase (scăderea răspunsurilor reflexe şi a percepţiei senzoriale, greutate în vorbire şi mers), cât şi tulburări gastro-intestinale.

Anemia rezultă din deteriorarea sau slăbirea sintezei ADN, care afectează formarea nucleului noilor eritrocite. În aceste cazuri, globulele roşii circulante sunt, în mare parte, forme primitive şi cu viaţă scurtă.

BUCAB / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Carența de cobalamină este adesea corelată cu cea de acid folic și, din această cauză, diferențierea celor două este dificilă.

Vitamina C

Vitamina C (acidul ascorbic) formează cristale incolore, cu p.t. 192°C, dextrogire, sensibile la oxidare și încălzire, care le anihilează acțiunea fiziologică. Acidul ascorbic este un agent reducător puternic (titrat cu iod, consumă imediat doi atomi de iod, cu formare de acid iodhidric). Produsul de oxidare ce ia astfel naștere, acidul dehidroascorbic, se transformă prin reducere din nou în acid ascorbic.

Prin încălzire cu acid clorhidric se formează furfurol, ceea ce arată că cei șase atomi de carbon formează o catenă liniară.

Oxidarea cu hipoiodit de sodiu conduce la un amestec de acid oxalic și acid L-treonic (fig. 1.31).

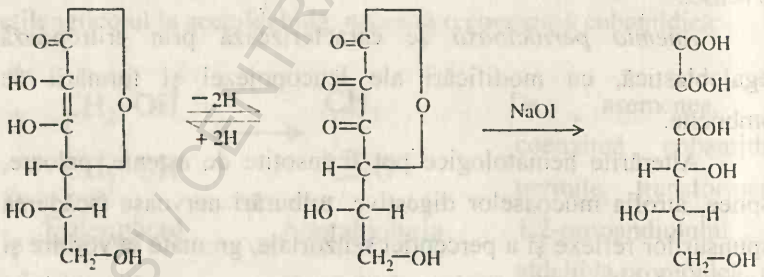
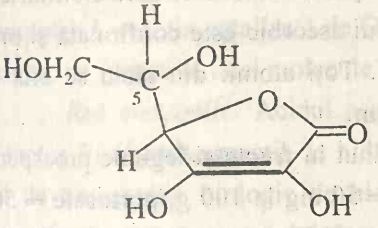


Fig. 1.31. Degradarea oxidativa a acidului ascorbic

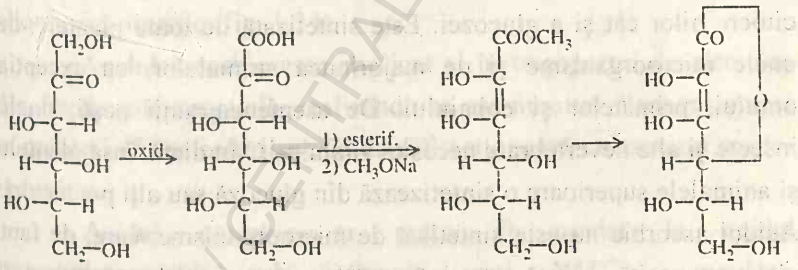
Acidul ascorbic este un acid de tăria acizilor carboxilici: el poate fi titrat cu hidroxizi alcalini, descompune carbonații și

formează săruri. Aciditatea sa este conferită de una din grupele OH enolice. Acidul dehidroascorbic nu are caracter acid, ci se titrează cu baze încet, ca o lactonă.



Acid L-ascorbic

Acidul ascorbic dă o coloraţie intensă cu clorura ferică datorită unei grupe endiolice —C(OH)=C(OH)—, ceea ce explică puterea reducătoare şi marea sensibilitate la reactivii bazici. Trebuie să mai remarcăm şi conjugarea p-π–π (4· n + 2 = 6 electroni), de unde şi comportarea acestei substanţe ca un compus dihidroxiaromatic cu un singur nucleu. De exemplu, 1,2 dihidroxibenzenul, adică pirocatechina, dă reacţii asemănătoare cu acidul ascorbic.



L-sorboza Acid 2-ceto-L-gulonic Acid ascorbic

Fig. 1.32. Sinteza industriala a acidului ascorbic

Structura acidului ascorbic a fost confirmată prin mai multe sinteze, dintre care una, aplicată industrial, porneşte de la L-sorboză, obţinută prin oxidarea fermentativă a D-sorbitolului (fig. 1.33).

Această monozaharidă trece prin oxidare (fie direct cu HNO_3, fie după protejarea grupelor OH, prin acetalizare cu acetonă) în acidul 2-ceto-L-gulonic. Esterul metilic al acestui acid se enolizează cu metoxid de sodiu şi se transformă apoi în lactonă cu acid clorhidric.

Structura aceasta a acidului ascorbic este confirmată şi prin analiză cristalografică cu raze X. Toţi atomii din ciclu se află în acelaşi plan; atomul C^5 iese din plan.

Acidul ascorbic este conţinut în fructe şi legume proaspete, în următoarele proporţii: lămâie — 50 mg la 100 g, portocale — 50-100 mg, tomate — 15 mg, cartof — 6-30 mg, spanac — 20-50 mg, pătrunjel — 150 mg, fructul măceşului (250-1400 mg/100 g). Deosebit de bogată în vitamina C este cătina albă (*Hippophae rhamnoides*). Conţinutul în acid ascorbic scade mult prin conservarea şi fierberea alimentelor.

Formarea vitaminei C depinde de prezenţa unui complex enzimatic ce conţine peroxidază şi ascorbic-oxidază, de prezenţa citocromilor cât şi a glucozei. Este sintetizată de toate plantele, de unele microorganisme şi de majoritatea animalelor, cu excepţia omului, primatelor şi cobaiului. De asemenea, unii peşti, unele insecte şi alte nevertebrate necesită vitamina C în dietă, însă plantele şi animalele superioare o sintetizează din glucoză sau alţi precursori. Acidul ascorbic nu este sintetizat de microorganisme, care, de fapt nici nu necesită această vitamină.

În sânge, durata de viaţă a vitaminei C este de aproximativ 16 zile, la animalele care o sintetizează.

Excesul este eliminat pe cale renală. O parte este degradată la acid oxalic, acid dicetogulonic, acid treonic şi mici cantităţi de CO_2, eliminat prin plămâni.

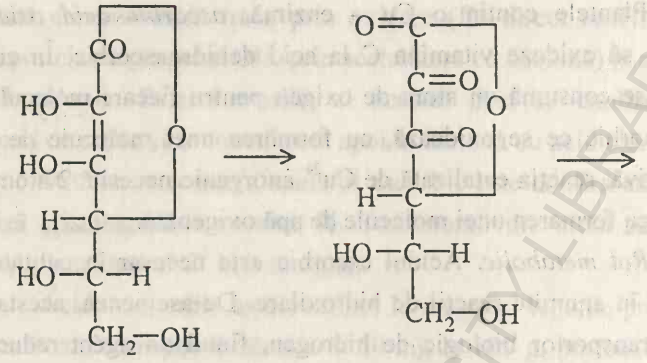
Plantele conţin o Cu – enzimă, *ascorbic acid oxidaza*, capabilă să oxideze vitamina C la acid dehidroascorbic. În cursul reacţiei se consumă un atom de oxigen pentru fiecare moleculă de acid ascorbic ce se oxidează, cu formarea unei molecule de apă. Dimpotrivă, reacţia catalizată de Cu^{2+} anorganic necesită 2 atomi de oxigen, cu formarea unei molecule de apă oxigenată.

Rol metabolic. Acidul ascorbic este necesar în calitate de cofactor în anumite reacţii de hidroxilare. De asemenea, acesta are rol de transportor biologic de hidrogen, finnd un agent reducător puternic. Activitatea vitaminică se menţine şi sub formă oxidată, ca acid dehidroascorbic. Activitatea vitaminică se pierde numai când se deschide ciclul lactonic şi se formează acidul dicetogulonic. Potenţialul redox al acidului L-ascorbic, comparabil cu cel al piridin-nucleotidelor, citocromului c şi glutationului, confirmă acest lucru. Fiind reducător, are rol în menţinerea activităţii SH-enzimelor.

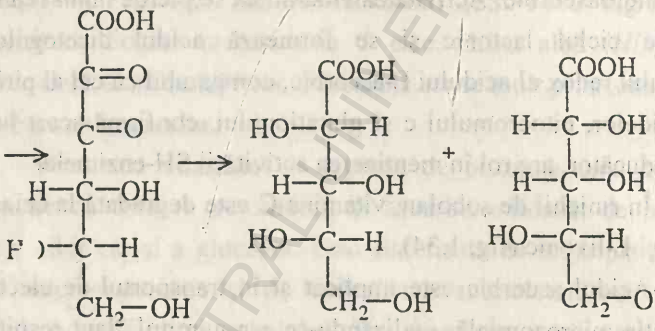
În rinichii de şobolan, vitamina C este degradată la acizii L-xilonic şi L-lixonic (fig. 1.34).

Acidul ascorbic este implicat şi în transportul de electroni din fracţia microzomială, realizându-se aşa-numitul "lanţ respirator microzomial", nefosforilant, în care funcţionează ca tampon oxido-reducător.

Acidul ascorbic ar putea fi oxidat la acidul monohidroascorbic sub influenţa unei *NAD^+ - oxidaze*. Monodehidroascorbatul acţionează ca purtător de hidrogen între nucleotidele reduse şi oxigen. Citocromul b_5, prezent în microzomi, ar putea acţiona ca o formă de oxidază a acidului ascorbic. El poate fi privit şi ca etapa finală, de conversie a 2OH la apă, de unde şi rolul său în hidroxilarea unor compuşi organici (fig. 1.35).



Acid L - ascorbic Acid dehidro - L - ascorbic



Acid 2,3 -diceto - L - gulonic Acid L - xilonic Acid L - lixonic

Fig. 1.34. Degradarea acidului L - ascorbic

Principalele reacții la care participă vitamina C sunt: hidroxilarea prolinei și lizinei pentru sinteza colagenului, hidroxilarea fenilalaninei, sinteza catecolaminelor, hidroxilarea sterolilor, desaturarea acizilor grași, absorbția fierului, metabolizarea xenobioticelor etc.

BCU "I. CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Carența în vitamina C sau aportul alimentar redus poate conduce la tulburări gastro-intestinale, boli infecțioase, neoplazii, afecțiuni metabolice cașectizante și la apariția scorbutului.

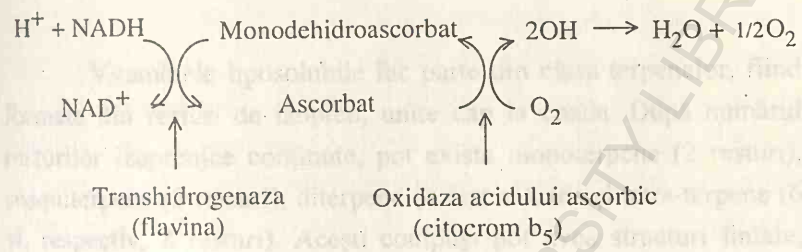


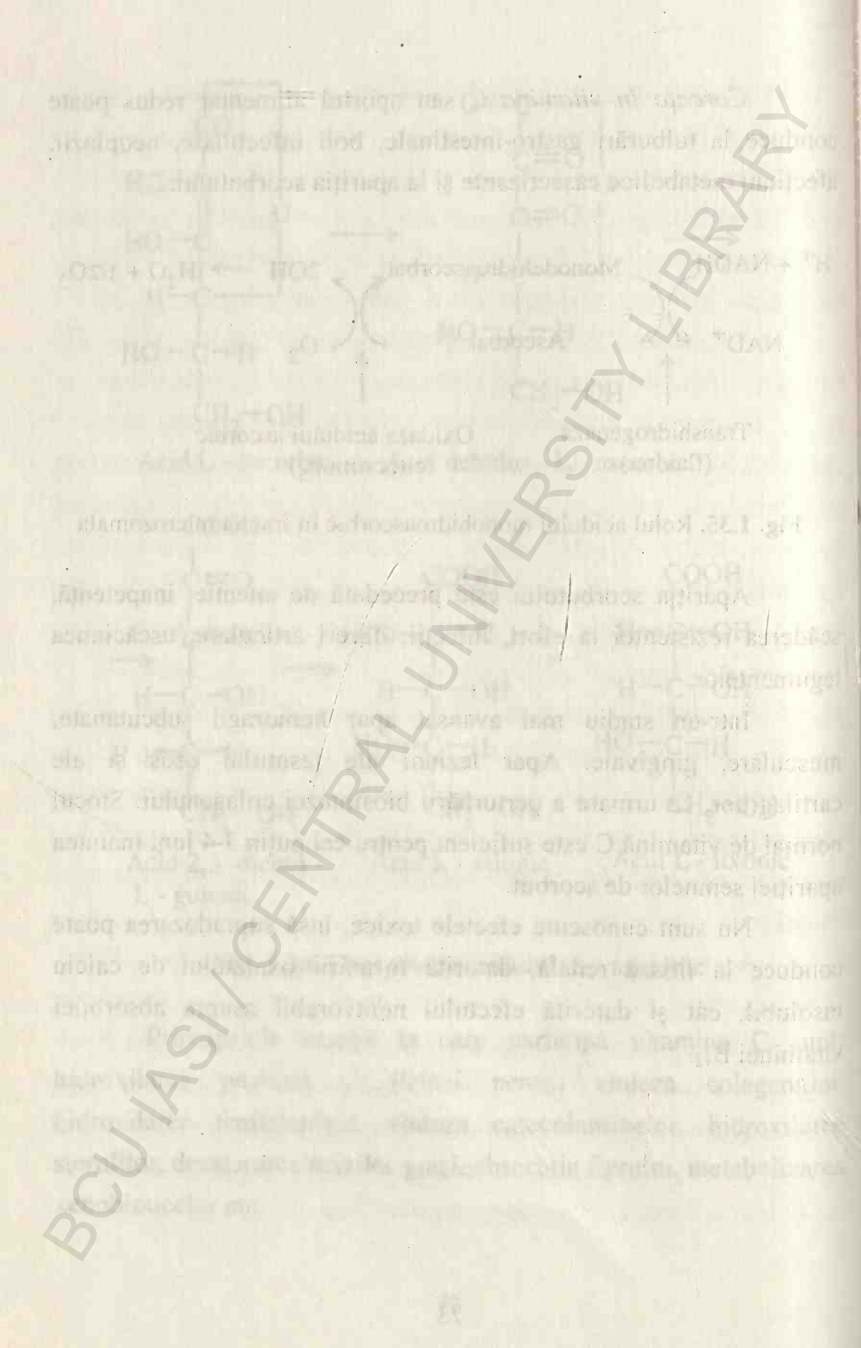
Fig. 1.35. Rolul acidului monohidroascorbic în fractia microzomala

Apariția scorbutului este precedată de anemie, inapetență, scăderea rezistenței la efort, infecții, dureri articulare, uscăciunea tegumentelor.

Într-un stadiu mai avansat apar hemoragii subcutanate, musculare, gingivale. Apar leziuni ale țesutului osos și ale cartilagiilor, ca urmare a perturbării biosintezei colagenului. Stocul normal de vitamină C este suficient pentru cel puțin 3-4 luni înaintea apariției semnelor de scorbut.

Nu sunt cunoscute efectele toxice, însă supradozarea poate conduce la litiază renală, datorită formării oxalatului de calciu insolubil, cât și datorită efectului nefavorabil asupra absorbției vitaminei B_{12}.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY


BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAP. II. VITAMINE LIPOSOLUBILE

Vitaminele liposolubile fac parte din clasa terpenelor, fiind formate din resturi de izopren, unite cap la coadă. După numărul resturilor izoprenice conținute, pot exista monoterpene (2 resturi), sesquiterpene (3 resturi), diterpene (4 resturi), tri- şi tetra-terpene (6 şi, respectiv, 8 resturi). Aceşti compuşi pot avea structuri liniare, ciclice sau combinate. Vitaminele liposolubile cuprind în molecula lor ambele tipuri de structuri.

Vitaminele liposolubile se găsesc în mod obişnuit asociate cu lipidele din alimentele naturate. Acestea (A, D, E, K) pot fi incluse chiar în clasa grăsimilor, fiind extrase din țesuturi cu solvenți organici nepolari (cloroform, eter). Ele nu sunt totuşi saponificabile, deoarece au o structură poliizoprenică. Absorbția lor se face în prezența grăsimilor, a bilei şi a sucului pancreatic. După absorbție, vitaminele liposolubile sunt transportate în sânge şi apoi depozitate în ficat (A, D, K) sau în țesutul adipos (vitamina E) pentru diferite perioade de timp. Supradozarea vitaminelor liposolubile conduce la instalarea unor stări toxice (hipervitaminoză), mai ales în cazul vitaminelor A şi D.

În sânge vitaminele liposolubile sunt transportate de lipoproteine sau proteine specifice, nefiind solubile în plasmă.

Nu sunt excretate în urină; în cea mai mare parte sunt eliminate pe cale biliară în fecale.

BCU IAŞI / CENTRALA UNIVERSITARĂ / LIBRARY

Vitamina A

Vitamina A reprezintă un factor de creştere al organismelor animalelor superioare. Lipsa sa determină la om hipercheratoză, descuamarea pielii şi hemeralopie (orbul găinilor). În lipsa sa, animalele tinere se opresc din creştere, oasele şi sistemul nervos nu se mai dezvoltă normal, rinichii şi glandele degenerează, iar atât femelele cât şi masculii devin sterili. Ochii sunt cei mai afectaţi. Bogate în vitamina A sunt ficatul de peşte, untul şi ouăle. Această substanţă nu se găseşte în plante. Plantele conţin însă carotine, precursori ai vitaminei A.

Există două vitamine, A_1 şi A_2, care pot fi oxidate la aldehide sau la acizi fără pierderea activităţii lor biologice. Vitamina A_2 se găseşte în peştii de apă dulce, în timp ce vitamina A_1 în ţesuturile mamiferelor şi în peştii marini.

Vitamina A_1 este un alcool polienic cu 20 atomi de carbon, cu duble legături conjugate, conţinând un ciclu de β-iononă (fig. 2.1).

Mecanismul formării vitaminei A_1, la nivelul mucoasei intestinale, presupune oxidarea β-carotenului în prezenţa carotenoxigenazei, la retinal, care este redus sub acţiunea NADPH la retinol şi, respectiv, oxidat la acid retinoic. Grupa de alcool primar din poziţia 15 se poate oxida în organism reversibil la aldehidă şi ireversibil la acid retinoic.

Adevărata provitamină A este β-carotina. α-Carotina este de asemenea o provitamină A, însă, pentru a obţine acelaşi efect fiziologic, trebuie utilizată o cantitate dublă din acest compus. Activitatea le este conferită de inelul β-ononic.

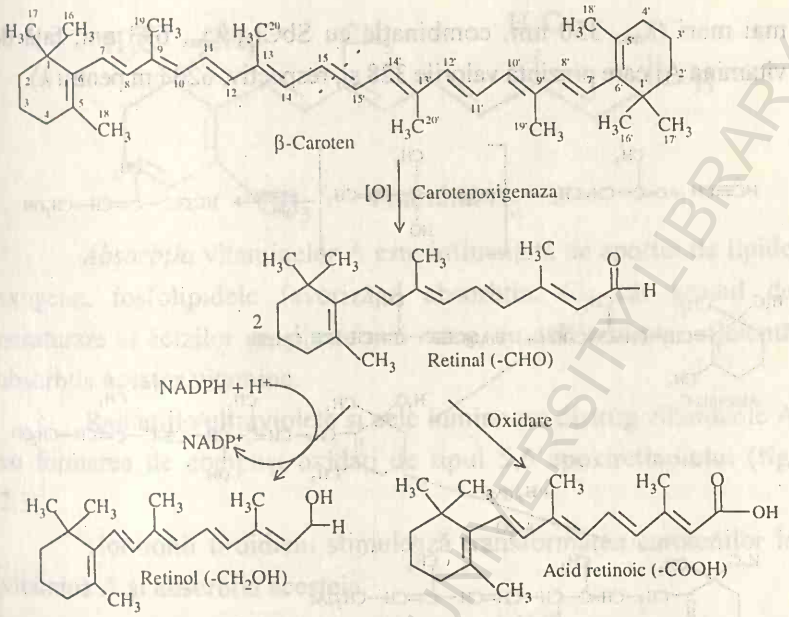


Fig. 2.1. Obținerea vitaminei A din β-carotină

Aproximativ 10% din carotenii ingerați sunt absorbiți ca atare la nivel intestinal sau sunt transformați în vitamina A, restul eliminându-se prin fecale.

Sinteza totală. Pentru stabilirea structurii și pentru obținerea vitaminei A pe cale industrială, se pleacă de la un alcool acetilenic preparat, prin reacția Favorski, din metil-vinil-cetonă. Compusul magnezian obținut din acest alcool și din bromură de etil-magneziu, se condensează cu aldehida C_{14}, iar produsul rezultat este redus și deshidratat pentru a se obține acetatul retinolului (fig. 2.2).

Vitamina A_2 conține o dubla legătură suplimentară între C_3 și C_4. Din această cauză ea are spectrul de absorbție deplasat spre λ

mai mari (λ_{max} 350 nm, combinația cu $SbCl_3$, λ_{max} 693 nm, față de vitamina A_1 care prezintă valorile 328 și, respectiv, 620 nm pentru λ).

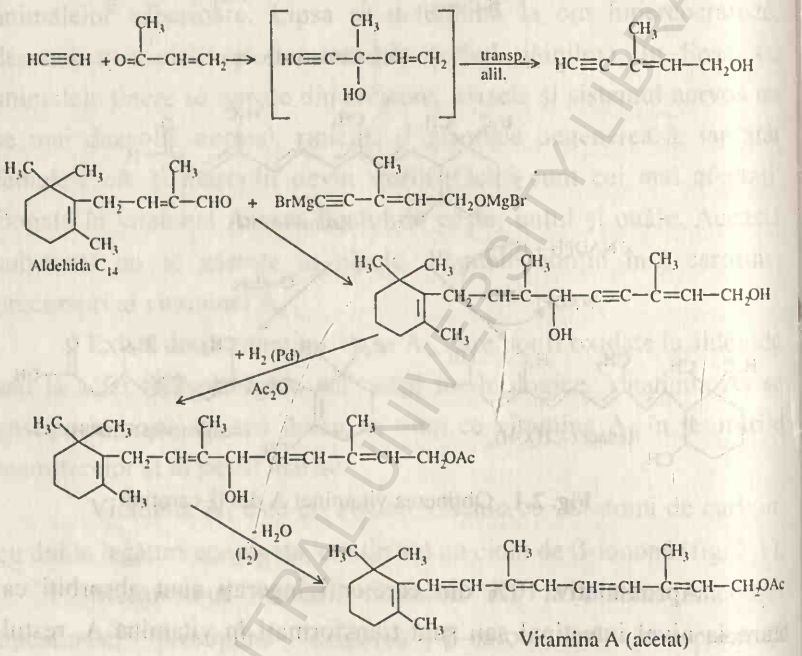
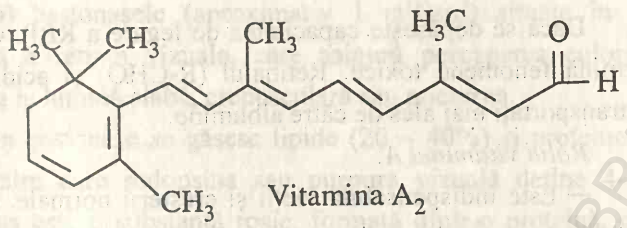


Fig. 2.2. Sinteza industriala a vitaminei A

Absorbția vitaminei A se face ca atare la nivelul intestinului subțire și, împreună cu vitamina A rezultată din caroteni, este esterificată cu acizi grași cu număr mare de atomi de C și încorporată astfel în chilomicronii limfatici. De aici, esterii trec în curentul sanguin, apoi în ficat unde sunt hidrolizați, iar retinolul este reesterificat cu acid palmitic și depozitat în picăturile lipidice hepatice (95% din totalul vitaminei A).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Vitamina A_2

Absorbția vitaminelor A este influențată de aportul de lipide exogene, fosfolipidele favorizând absorbția. Cu cât gradul de nesaturare al acizilor grași este mai mare, cu atât este mai eficientă absorbția acestor vitamine.

Radiațiile ultraviolete și cele luminoase distrug vitaminele A cu formarea de compuși oxidați de tipul 5,6 epoxiretinolului (fig. 2.3).

Hormonii tiroidieni stimulează transformarea carotenilor în vitamina A și absorbția acesteia.

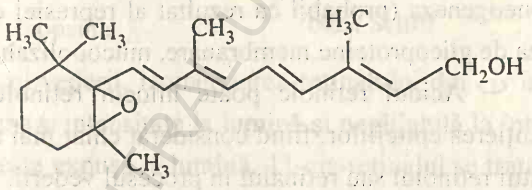


Fig. 2.3. Epoxi - 5,6 - retinolul

Transportul. După hidroliza esterilor la nivelul ficatului, retinolul liber este preluat de o proteină de transport — RBP (Retinol Binding Protein) aproximativ 70% și de lipoproteine, 20%. Sinteza RBP este dependentă de zinc. RBP mobilizează vitamina A din ficat și o solubilizează în mediu apos, transportând-o la celula țintă, cu protejarea retinolului de acțiunea oxidanților.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă se depăşeşte capacitatea de legare a RBP, vitamina A determină fenomene toxice. Retinalul (R-CHO) şi acidul retinoic sunt transportaţi mai ales de către albumine.

Rolul vitaminei A:

— Este indispensabilă vieţii şi creşterii normale. În absenţa vitaminei A, creşterea animalelor este oprită şi cu timpul acestea mor.

— Exercită o acţiune protectoare asupra epiteliilor, asupra mucoaselor, împiedicând pătrunderea microorganismelor (acţiune antiinfecţioasă).

— Retinolul ($-CH_2OH$) este implicat în funcţionarea aparatului genital şi de reproducere (spermatogeneză). În acest caz, acţionează în calitate de hormoni, printr-un mecanism asemănător cu al hormonilor steroizi. Deficienţa de vitamina A scade gluconeogeneza (probabil ca rezultat al represiei de cortizol), scade sinteza de glicoproteine membranare, mucopolizaharide şi colesterol.

— Acidul retinoic poate înlocui retinolul în creşterea şi diferenţierea epiteliilor, fiind considerat chiar mai activ, dar nu poate substitui retinolul sau retinalul în procesul vederii.

— Are rolul cel mai important în procesul vederii, unde acţionează sub formă de 11-cis-retinal (-CHO), în calitate de grupare prostetică a tuturor pigmenţilor fotosensibili din retină.

În partea posterioară a retinei se găsesc două tipuri de celule fotoreceptoare:

a) conurile, de mici dimensiuni, situate în partea centrală a retinei vizuale (aproximativ 3 milioane), asigură adaptarea la lumină puternică şi colorată;

b) bastonaşele (aproximativ 1 miliard) situate în partea periferică a retinei vizuale, care asigură perceperea culorilor şi adaptarea la lumină slabă, crepusculară sau nocturnă.

În bastonaşe se găsesc lipide (20 – 40%) şi proteine (40 – 50%) dintre care rodopsina sau purpura vizuală deţine 4-10 %. Rodopsina este o substanţă roşie, formată dintr-o proteină, opsina, legată strâns de 11-cis-retinal. Aceasta absoarbe o cuantă de lumină, trece într-un compus cu caracter radical-ion, numit "portocaliu-trecător", din care, după puţin timp, se regenerează rodopsina.

11-Cis-retinalul se leagă prin gruparea aldehidică de grupa NH_2 a unui rest de lizină din opsină (partea proteică) sub forma unei baze Schiff protonate:

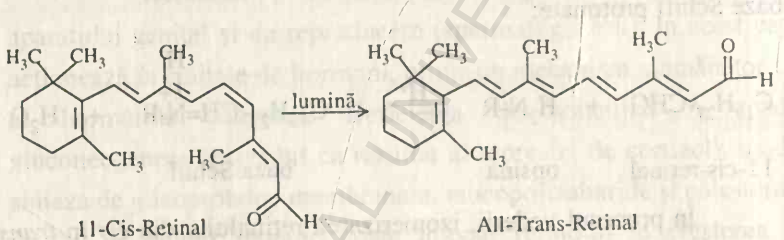
$$C_{19}H_{27}\text{-CHO} + H_2N\text{-R} \underset{}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} C_{19}H_{27}\text{-CH=}\overset{\overset{H}{|}}{\underset{|}{N^+}}\text{-R} + H_2O$$

11-cis-retinal opsina baza Schiff

În procesul vederii, izomerizarea retinalului din *cis* în *trans* se realizează cu mare intensitate la lumină şi neglijabilă la întuneric. Când rodopsina este expusă la lumină, 11-cis-retinalul se transformă în all-trans-retinal, cu o configuraţie substanţial schimbată. Reacţia nu este enzimatică, ci doar fotochimică şi poate avea loc chiar la temperatura azotului lichid. Izomerizarea retinalului este urmată de alte schimbări moleculare, culminând cu disocierea rodopsinei, care devine astfel albă, în opsină liberă şi all-trans-retinal. Acest mecanism funcţionează ca un declanşator al impulsului nervos şi permite perceperea luminii de către creier. Absorbţia luminii de către veziculele discuidală cu membrană din celulele bastonaş determină schimbarea conformaţiei moleculelor de rodopsină, concomitent cu

conversia 11-cis-retinal în all-trans-retinal. Această schimbare modifică permeabilitatea membranei veziculelor şi a potenţialul de membrană, aşa încât ionii de Ca^{2+} ies din vezicule, declanşând impulsul nervos. Ca^{2+} serveşte ca un mesager sau mediator prin care stimulul luminos este cuplat cu sistemul receptor din creier, aşa cum se întâmplă în cazul muşchiului, când calciul face legătura între impulsul nervos şi sistemul contractil al muşchiului.

Pare posibil ca vitamina A să joace un rol important în transportul calciului prin anumite membrane, analog rolului jucat de aceasta în celulele bastonaş; s-ar explica astfel efectele lipsei de vitamina A sau a excesului său asupra ţesutului osos.



11-Cis-Retinal All-Trans-Retinal

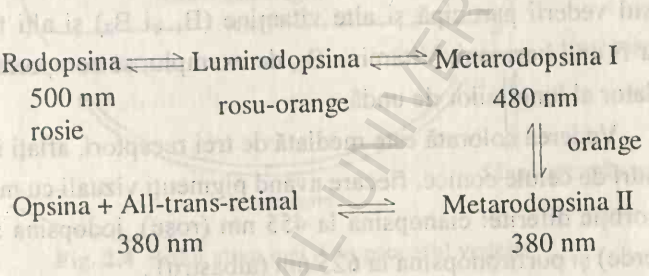
All-trans-retinalul este sărac în energie şi deci mai stabil, motiv pentru care reacţia sa de formare este însoţită de o mare degajare de energie.

— Izomerizarea cis-trans alterează geometria labilă a moleculei de rodopsină. Astfel, rodopsina care are o structură helicoidală în proporţie de 60%, pierde aproximativ 1/5 din această structură prin deplasarea cu aproximativ 7 Å a legăturii Schiff faţă de ciclul grupei cromofore sub acţiunea luminii, când are loc "decolorarea" rodopsinei. Maximul de absorbţie al rodopsinei se deplasează de la 500 nm (roşu) spre spectrul retinalului liber (380

nm) cu formarea unor intermediari cu maxim de absorbție și culori diferite.

În procesul vederii există o secvență de reacții biochimice care se desfășoară ciclic. În cursul excitației luminoase are loc deci izomerizarea *11-cis-* în *all-trans-retinal*, adică "decolorarea" rodopsinei prin eliberarea finală a opsinei și all-trans-retinalului.

La întuneric, când segmentul extern al bastonașului, specializat în fotorecepție, este în repaos, au loc reacțiile de refacere a rodopsinei, adică transformarea all-trans-retinalului în 11-cis-retinal și legarea lui de opsină.



Refacerea 11-cis-retinalului se realizează astfel:

a) *Calea minoră*: all-trans-retinalul se transformă în 11-cis-retinal direct, sub influența transretinal-izomerazei (opsina ar funcționa ca o fotoizomerază, activată de lumină, care acționează asupra 11-cis-retinalului ca substrat);

b) *Calea majoră*: o mare parte din all-trans-retinal se reduce la all-trans-retinal (—CH_2OH) și acesta izomerizează la 11-cis-retinol, urmată de oxidarea la 11-cis-retinal (—CHO).

În reacțiile de reducere și oxidare participă în calitate de acceptor și respectiv donor de hidrogen sistemul $NAD^+/NADH+H^+$,

BUCUR CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în calitate de coenzimă a alcool dehidrogenazei (retinol dehidrogenaza).

În retină există un echilibru între retinal şi retinol, iar între ochi şi restul organismului sunt schimburi continue de vitamina A.

Instalarea tulburărilor vizuale (hemeralopie) datorită carenţei în vitamina A se explică prin scăderea refacerii rodopsinei din cauza aportului insuficient de precursori. Existenţa hemeralopiei independente de carenţa de vitamină A (glaucom, la bătrâni, diabet, graviditate, boli hepatice, intoxicaţii cu alcool, Pb, As, etc.) s-ar datora alterării echilibrului "retinal — retinol" şi faptului că în procesul vederii participă şi alte vitamine (B_1 şi B_2) şi alţi factori, cum ar fi unii hormoni. Vitamina B_2, de exemplu, se comportă ca un modulator al lungimilor de undă.

Vederea colorată este mediată de trei receptori, aflaţi în cele trei tipuri de celule conice, fiecare având pigmenţi vizuali cu maxime de absorbţie diferite: cianopsina la 455 nm (roşu), iodopsina la 530 nm (verde) şi porfirodopsina la 625 nm (albastru) .

Grupa cromoforă a acestor pigmenţi este tot 11-cis-retinolul, proprietăţile fiind conferite de interacţiunea cu opsina, care este diferită la cei trei pigmenţi.

Necesarul de vitamină A depinde de greutatea corporală, de vârstă, climă, stare fiziologică etc. Cerinţele sunt mai mari într-un regim bogat în lipide.

Tulburările de aport vitaminic se datorează lipsei din alimente, incapacităţii organismului de a transforma carotenii în vitamina A, tulburărilor de absorbţie a lipidelor, carotenilor şi a vitaminei, depozitării insuficiente (boli hepatice), deficienţei de Zn (necesar mobilizării vitaminei A din ficat), malnutriţiei proteice.

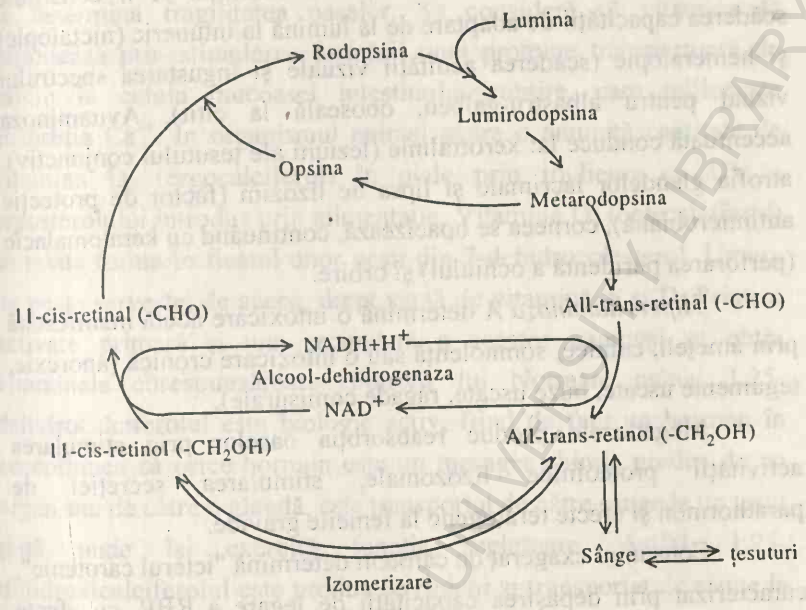


Fig. 2.4 Rolul vitaminei A în procesul vederii

Deficiența la copii și animale tinere afectează sistemul osos (oprirea creşterii oaselor, erupții dentare întârziate, rădăcini rău implantate, alterarea emailului dentar) şi, în continuare, a țesuturilor moi.

Diviziunea celulară este oprită şi apare atrofia celulelor deja formate. Creşterea este mult întârziată, inclusiv aceea a sistemului nervos.

Epiteliile apar keratinizate, ceea ce determină tulburări ale glandelor exocrine: lacrimale, din piele, tractul digestiv, respirator, urogenital. Pot apare infecții spontane.

BCU "AS" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Principalul efect al carenței în vitamina A îl constituie scăderea capacității de adaptare de la lumină la întuneric (nictalopie) și hemeralopie (scăderea acuității vizuale și îngustarea spectrului vizual pentru albastru-galben, oboseală la citit). Avitaminoza accentuată conduce la: xeroftalmie (leziuni ale țesutului conjunctiv), atrofia glandelor lacrimale și lipsa de lizozim (factor de protecție antimicrobiană), corneea se opacizează, continuând cu keratomalacie (perforarea purulentă a ochiului) și orbire.

Hipervitaminoza A determină o intoxicare acută manifestată prin amețeli, cefalee, somnolență sau o intoxicare cronică (anorexie, tegumente uscate, buze uscate, ragade comisurale).

Megadozele produc reabsorbția oaselor prin stimularea activității proteolitice lizozomale, stimularea secreției de parathormon și efecte teratogene la femeile gravide.

Consumul exagerat de caroteni determină "icterul carotenic", caracterizat prin depășirea capacității de legare a RBP, cu efecte litice asupra membranelor biologice. Lezarea membranelor eritrocitare de către retinol este inhibată de vitamina E.

Vitamina D

Vitamina D (calciferol) este numele unei grupe de steroide asemănătoare ca structură. Se cunosc 5 vitamine D, numerotate de la 2 la 6, cu structură chimică și acțiune fiziologică asemănătoare. Dintre acestea, vitamina D_2 (ergocalciferolul) și vitamina D_3 (colecalciferolul) sunt formele active pentru mamifere. Lipsa vitaminei D conduce la tulburări în metabolismul calciului și fosforului,iar la copii determină rahitismul. Vitamina D ingerată o

singură dată poate fi stocată în ficat timp de câteva săptămâni. Lipsa sa determină fragilitatea oaselor. Se consideră că vitamina D acționează prin stimularea formării unei proteine transportoare de calciu în celula mucoasei intestinului subțire, care mijlocește absorbția Ca^{2+}. În organismul animal apare o anumită cantitate de vitamina D_2 (ergocalciferol) în piele prin iradierea cu UV a ergosterolului introdus prin alimentație. Vitamina D_3 (colecalciferol) se poate forma în ficatul unor pești din 7-dehidrocolesterol. Untura de pește servește, de aceea, drept sursă de vitamină A și D. Printr-o activare primară și una secundară a acestor compuși se obțin vitaminele corespunzătoare. Potrivit lui Norman, numai 1,25-dehidrocalciferolul este biologic activ, fiind de fapt un hormon în accepțiunea că orice hormon este un mesager chimic produs de un organ sau de către o glandă, este transportat de către sânge la un țesut țintă unde își exercită funcția reglatoare. Astfel, 1,25-dihidroxicalciferolul este produs de rinichi și transportat de sânge la intestin și oase. El diferă însă de ceilalți hormoni prin aceea că precursorii săi provin din hrană.

Sterolul din drojdie, ergosterolul este convertit prin iradiere UV în ergocalciferol. Omul necesită aproximativ 20 μg de vitamină D pe zi. Ergosterolul, provitamina D_2 și 7-dehidrocolesterolul (provitamina D_3) nu prezintă activitate vitaminică.

Activarea primară. Sub acțiunea razelor UV rezultă ergocalciferol (D_2) și, respectiv, colecalciferolul (D_3) care au o structură trienică ce le conferă activitate antirahitică și o catenă laterală de care este legată intensitatea activității vitaminice.

Suprairadierea conduce la compuși toxici. Formarea

compuşilor toxici prin reacţii secundare este evitată prin două mecanisme:

a) melanina din piele concurează în captarea radiaţiilor UV, limitând formarea provitaminei;

b) izomerizarea fotochimică a provitaminei D_3 la produşi inactivi biologic (lumisterol$_3$, tahisterol$_3$) frânează sinteza în exces a provitaminei.

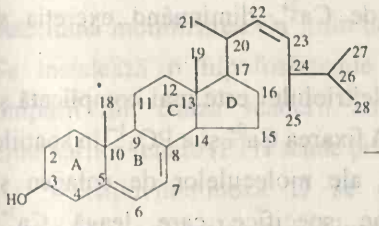
Deoarece prin expunere la soare se formează suficientă vitamina D_3, aceasta este privită de asemenea mai mult ca hormon decât ca vitamină.

Prima hidroxilare a vitaminei D_3 are loc în ficat, în poziţia 25 a catenei laterale, formându-se 25-hidroxi-D_3. Enzima de hidroxilare este localizată în fracţiunea microzomală, mai precis în reticulul endoplasmatic neted şi necesită NADPH, O_2 şi Mg^{2+}. S-ar părea că în această hidroxilare nu este necesară intervenţia citocromului P_{450} deoarece procesul nu este inhibat de CO sau alţi inhibitori specifici pentru acest citocrom.

Forma hidroxilată în poziţia 25 nu acţionează asupra ţesuturilor şi este necesară o nouă hidroxilare. Această reacţie are loc la nivelul rinichiului printr-un proces asemănător celor din sinteza sterolilor în glandele suprarenale. Sistemul enzimatic este localizat în membrana internă a mitocondriei şi necesită pe lângă NADPH, O_2 şi citocromul P_{450}. Rezultă 1,25-dihidroxi-colecalciferolul sau 1,25-dihidroxi-D_3 care este transportată de o proteină specifică la intestin unde declanşează procesele implicate în absorbţia calciului.

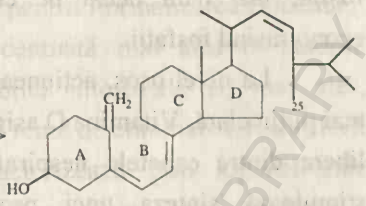
Activarea secundară constă din două procese de hidroxilare succesivă în ficat şi rinichi.

BCU MARIN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

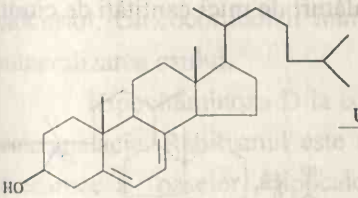


Ergosterol
(alimente)

UV

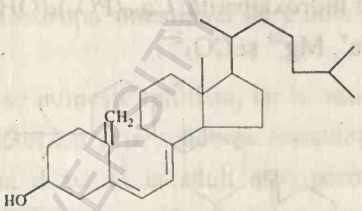


Ergocalciferol (Vitamina D_2)



7-Dehidrocolesterol
(din piele)

UV



Colecalciferol (Vitamina D_3)

Rol metabolic. 1,25-$(OH)_2$-D_3 sau calcitriolul (C) reglează metabolismul fosfo-calcic prin acțiunile exercitate asupra țesuturilor țintă: intestin, os, rinichi.

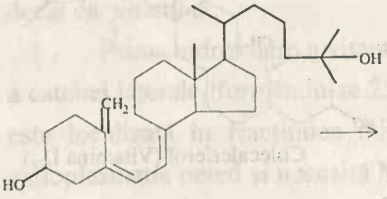
La nivelul intestinului, calcitriolul (C) este transportat la locul de acțiune unde se fixează pe proteine receptoare citoplasmatice şi apoi este translocat la nucleu unde, printr-un mecanism mai puțin cunoscut, induce sinteza unei proteine transportoare de calciu (Calcium Binding Protein — CaBP) care favorizează absorbția Ca^{2+} contra gradientului de concentrație, mecanism de acțiune similar acțiunii unui hormon steroid.

La nivelul tubilor renali, 1,25-$(OH)_2$-D_3 stimulează sinteza CaBP renale şi deci reabsorbția, preîntâmpinând excreția excesivă de Ca^{2+}. În condiții normale, calcitriolul stimulează reabsorbția de

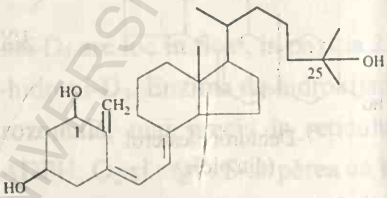
BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fosfat, mai mult decât pe cea de Ca^{2+}, diminuând excreția și economisind fosfații.

La nivel osos, acțiunea calcitriolului este mai complicată și mai puțin clară. Vitamina D asigură fixarea Ca^{2+} și a PO_4^{3-} în spațiile libere dintre capetele nespiralate ale moleculelor de colagen și stimulează sinteza unei proteine specifice care leagă Ca^{2+}, osteocalcina. Calciul se fixează în zona minerală a osului, sub formă de hidroxiapatită, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, alături de mici cantități de citrat, Na^+, Mg^{2+} și CO_3^{2-}.



25-Hidroxicolecalciferol



1, 25-Dihidroxicolecalciferol

Hipovitaminoza D determină sinteza redusă a proteinei specifice care leagă ionul Ca^{2+} la nivelul mucoasei intestinale. Scade și secreția de parathormon (PTH), ceea ce determină defecte în mineralizarea osului. Oricând concentrația Ca^{2+} din sânge scade față de normal, glandele paratiroide secretă cantități mărite de parathormon, un polipeptid ce conține 84 resturi aminoacide. Acest hormon acționează asupra rinichilor, stimulându-lecrete cantități mai mari de fosfat în urină și să producă o cantitate mai mare de 1,25-dihidroxicolecalciferol din precursorul său, 25-hidroxicolecalciferol. Hormonul paratiroidei poate fi considerat astfel ca un hormon tropic pentru 1,25-dihidroxi-D_3. Un hormon tropic pentru un altul este acela care stimulează sinteza sau secreția acestuia din urmă.

În deficiența de vitamina D apare hipocalcemia, însoțită secundar și compensatoriu de creșterea secreției de PTH, iar PTH

determină mobilizarea Ca^{2+} din oase pentru normalizarea calcemiei. Se instalează o hipofosfatemie accentuată mai ales în stadiile timpurii din cauza scăderii absorbției intestinale și, mai ales, eliminărilor renale (PTH scade pragul renal de eliminare a fosfaților).

Hipovitaminoza D se caracterizează prin hipocalcemie moderată normocalcemie, hipofosfatemie, activitatea crescută a fosfatazei alcaline, nivele crescute de parathormon și scăzute de calcitriol. Glucocorticoizii inhibă absorbția intestinală de calciu și mineralizarea osului.

Hipovitaminoza D la copil se numește rahitism, iar la adult, osteomalacie. Rahitismul este caracterizat prin scăderea rezistenței mecanice a oaselor. Hipocalcemia dezvoltă la adult osteoporoza (reducerea masei osoase pe unitate de volum sub nivelul normal). Tratamentul cu estrogeni previne instalarea osteoporozei (aceștia protejează osul împotriva agenților care determină resorbția osului, în special PTH).

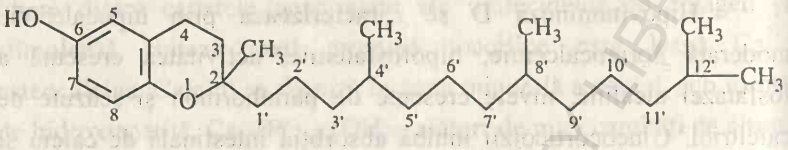
Hipervitaminoza D. Intoxicațiile cu vitamina D se caracterizează prin anorexie, vărsaturi, diaree, astenie, mialgie, pierdere în greutate, hipercalcemie, hipercalciurie. Are loc o tendință de calcifiere a țesuturilor moi. Aceasta se combate prin regim sărac în Ca și fosfați care conduce la mobilizarea lentă a Ca din țesuturi și revenirea la normal a calcemiei. Funcția renală se normalizează, dacă nu a fost grav compromisă.

Vitamina E

Vitamina E se numește tocoferol sau vitamina antisterilității (tokos = progenitură; pherein = a naște; ol = alcool) și reprezintă un grup de 7 vitamine E cu o structură chimică analogă: α, β, γ, δ, ε, ξ, și

η–tocoferoli. Proprietățile vitaminice sunt proporționale cu numărul grupelor –CH_3, deci α-tocoferolul va fi cel mai activ biologic.

Vitaminele E sunt lichide incolore, vâscoase, care formează derivați (esteri, uretani) cristalizați.



Tocol [2-metil-2 (4',8',12' trimetiltridecil) croman-6-ol]

Vitamina E a fost descoperită de Evans (1922) în uleiul de embrion de grâu şi, mai târziu, în alte materiale vegetale. Lipsa acestei vitamine produce degenerarea muşchilor. Ea intervine în procesele de oxidare celulară, în metabolismul creatininei din muşchi şi în metabolismul hidraților de carbon favorizând depunerea glicogenului în țesuturi. Există patru tocoferoli având o catena laterală derivând de la fitol, iar alți patru, mai puțin importanți, numiți tocotrienoli, au o catenă cu acelaşi schelet, dar cu trei duble legături.

Sinteza α-tocoferolului a fost stabilită de către Fernholz (1938), iar Karrer a realizat sinteza sa. O altă sinteză (fig. 2.5) a fost realizată prin condensarea trimetil-hidrochinonei cu fitol, în prezență de acizi (Isler).

Absorbția are loc la nivelul intestinului subțire, în mod similar celorlalte vitamine liposolubile. De la intestin, pe cale limfatică, tocoferolii trec în sânge unde sunt vehiculați de β-lipoproteinele plasmatice, apoi sunt repartizați în toate organele, depozitele făcându-se în țesutul adipos.

Vitaminele E se acumulează în fosfolipidele membranelor citoplasmatice şi mitocondriale şi în reticulul endoplasmatic.

Concentrația vitaminelor E în aceste organite depinde de aportul vitaminic, de peroxidanți, antioxidanți, de seleniu alimentar și de aportul de aminoacizi cu sulf.

Tocoferolii sunt transformați, în procesele metabolice, în compuși chinonici, hidrochinonici care se elimină prin bilă, 80%, iar restul prin urină, sub formă conjugată cu acidul glicuronic.

α- și γ-Tocoferolii au fost obținuți în stare cristalină, iar ceilalți în formă uleioasă. Sunt substanțe optic active, termolabile în prezența oxigenului, însă stabile în absența sa. Tocoferolii sunt autooxidabili, din care cauză sunt antioxidanți puternici. Stabilitatea lor scade de la γ la α-tocoferol, în timp ce acțiunea lor biologică crește în același sens, α-tocoferolul fiind cel mai activ.

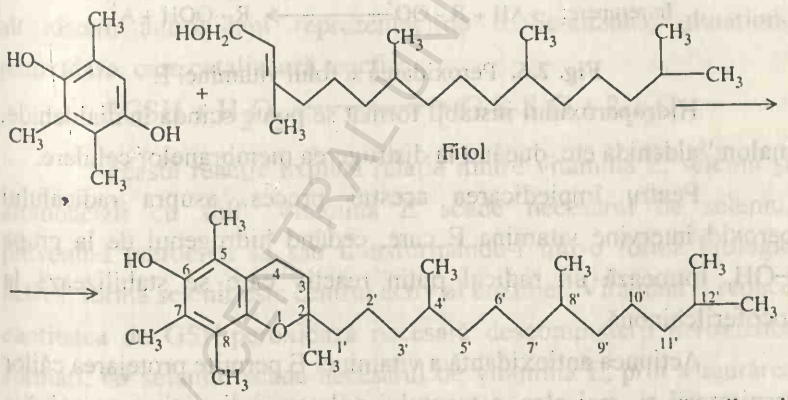


Fig. 2.5. Sinteza vitaminei E

Rol biochimic. Vitamina E este considerată cel mai eficace antioxidant liposolubil natural. Substanțele cele mai sensibile la

peroxidare sunt lipidele celulare şi lipidele din membranele organitelor subcelulare şi, mai ales, lipidele nesaturate.

Sub acţiunea oxigenului molecular, acizii polinesaturaţi formează peroxizi lipidici prin peroxidare, proces autocatalitic, care se desfăşoară după un mecanism radicalic, prin reacţii înlănţuite (fig. 2.6). A· este un radical stabil (de exemplu, provenit din tocoferol), capabil să inhibe propagarea reacţiilor radicalice în lanţ din peroxidarea lipidică.

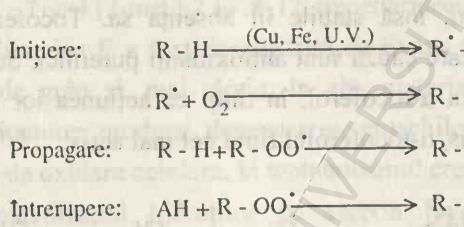


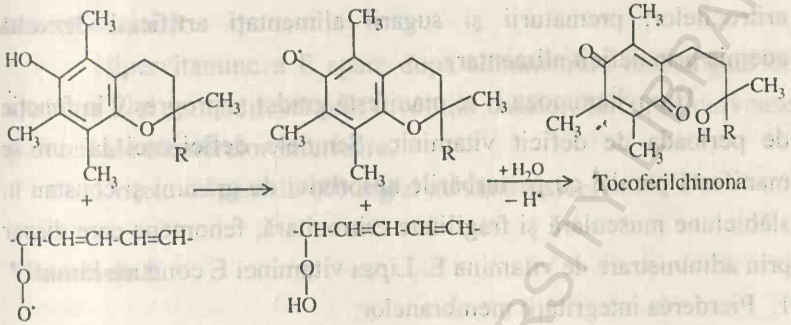
Fig. 2.6. Peroxidarea si rolul vitaminei E

Hidroperoxidul instabil format se poate scinda în dialdehide, malondialdehidă etc. ducând la distrugerea membranelor celulare.

Pentru împiedicarea acestui proces, asupra radicalului peroxid intervine vitamina E care, cedând hidrogenul de la grupa —OH, formează un radical puţin reactiv care se stabilizează la tocoferilchinonă.

Acţiunea antioxidantă a vitaminei E permite protejarea căilor respiratorii şi, mai ales, a ţesutului pulmonar de acţiunea nocivă a aerului poluat (O_3, N_2O). Rolul antioxidant al tocoferolilor este conferit de gruparea hidroxil în poziţia C_6. Esterificarea acestuia cu acid acetic, butiric sau fosforic conduce la derivaţi cu o activitate antioxidantă mai intensă. Amputarea catenei laterale sau reducerea mărimii sale micşorează activitatea vitaminică până la dispariţie.

Este posibil ca vitaminele E să joace şi rolul de cofactori în sistemul de transport al electronilor. Catena laterală poate juca un rol de stabilizare a stărilor radicalice ale vitaminei E.



Peroxidarea lipidelor se înregistrează chiar în prezenţa concentraţiei fiziologice de vitamină E. Organismul dispune şi de un alt sistem antioxidant reprezentat de o Se-enzimă, glutation-peroxidaza, care catalizează reacţia:

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow G\text{-}S\text{-}S\text{-}G + 2H_2O$$

Această reacţie explică relaţia dintre vitamina E, seleniu şi aminoacizii cu sulf. Vitamina E scade necesarul de seleniu, prevenind pierderea sa sau transformându-l într-o formă biologic activă, forma selenit este centrul activ al enzimei. Vitamina E reduce cantitatea de GSH-peroxidază necesară descompunerii peroxizilor formaţi, iar seleniul scade necesarul de vitamina E, prin asigurarea funcţiei normale a pancreasului şi, prin aceasta, a digestiei şi absorbţiei lipidelor, implicit a vitaminei E.

Seleniul, cofactor al GSH-peroxidazei (4 atomi Se / moleculă) contribuie la distrugerea peroxizilor, reducând necesarul de vitamina E pentru menţinerea integrităţii membranelor.

BCMJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina E şi seleniul au acţiune sinergică în menţinerea nivelului ridicat de Co Q (coenzima Q, component al lanţului respirator). Vitamina E are rol în hematopoieză şi în stabilitatea eritrocitelor; prematurii şi sugarii alimentaţi artificial dezvoltă anemie prin deficit alimentar.

Hipovitaminoza E se manifestă gradat şi progresiv în funcţie de perioada de deficit vitaminic. Semnele deficienţei la om se manifestă paralel cu perturbările absorbţiei de grăsimi şi constau în slăbiciune musculară şi fragilitate eritrocitară, fenomene care dispar prin administrare de vitamina E. Lipsa vitaminei E conduce la:

1. Pierderea integrităţii membranelor;
2. Hemoliza celulelor roşii;
3. Scăderea fosforilării oxidative;
4. Scăderea formării lipidelor;
5. Scăderea resperaţiei la nivelul ficatului;
6. Modificarea raportului ADN/ARN;
7. Diminuarea depozitului de vitamina A;
8. Tulburări în transportul de electroni în mitocondrii, înaintea *citocromului c.*

Independent de gradul de alterare a lipidelor, la animale, s-au evidenţiat tulburări ale aparatului genital şi a capacităţii de reproducere la ambele sexe.

Există date conform cărora concentraţia sanguină de tocoferoli creşte progresiv în sarcină până la 50-100 % sau chiar mai mult în ultima lună faţă de primul trimestru de sarcină. Aceasta constituie o condiţie pentru evoluţia şi dezvoltarea fătului. Nu se ştie însă precis dacă vitamina E este necesară în sarcină.

Revenirea la valori normale se face în primele 2-5 luni de la naştere, însă ea creşte în lapte. La femeile cu avort, concentraţia tocoferolului în sânge este de 2-4 ori mai scăzut decât la femeile cu sarcină normală.

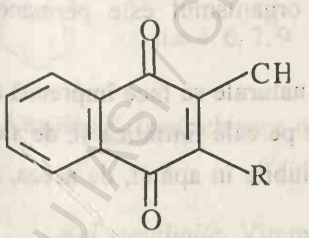
Hipervitaminoza E apare după administrare îndelungată de vitamina E şi se manifestă prin involuţia oaselor, tulburări nervoase şi dureri ale membrelor inferioare.

Dozele de până la 100 mg/zi nu sunt toxice.

Vitaminele K

Vitaminele K (filochinona, farnochinona, menachinonele, menadiona, numite generic vitamina coagulării, vitamina antihemoragică, factor protrombinic) sunt derivaţi de naftochinonă care conţin sau nu un radical la C_3 cu un număr variabil de atomi de carbon.

În procesul de vindecare a rănilor, tromboplastina eliberată de ţesutul rănit, împreună cu ionii de calciu, transformă protrombina în trombină. Odată formată, trombina converteşte fibrinogenul din plasmă în fibrină insolubilă (cheag). Vitamina K este necesară formării protrombinei, un proces ce are loc în ficat.



Vitamina K_1 (filochinona) are la C_3 un lanţ lateral de fitil cu 20 atomi de carbon). Vitamina K_2 (farnochinona) conţine un radical difernesil (30 atomi de carbon).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina K_3 (menadiona), nu are radicalul lateral (R = H), este sintetică şi este solubilă în apă spre deosebire de K_1 şi K_2.

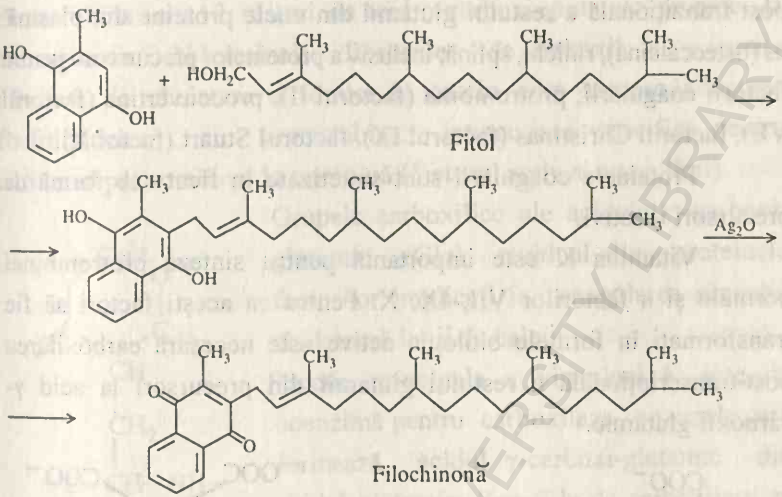
Vitamina K_1 a fost descoperită de Dam (1929) în plantele verzi. Structura sa a fost stabilită prin degradare oxidativă şi prin sinteză. Prima conduce la acidul 2-metil-α-naftochinon-3-acetic şi la cetona $C_{18}H_{36}O$ (trimetilpentadecanona), identică cu cea obţinută din fitol Doisy). Sinteza a fost realizată prin condensarea 2-metil-naftohidrochinonei cu fitol în prezenţă de acid oxalic.

Vitamina K_2 a fost obţinută din făina de peşte intrată în putrefacţie şi este produsă de fapt de către bacteriile de putrefacţie. De asemenea, *Bacterium coli* din flora intestinală a omului sintetizează importante cantităţi de vitamina K_2.

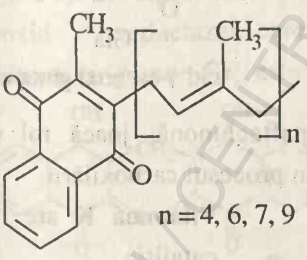
Pentru a avea activitate fiziologică, vitaminele K trebuie să posede un nucleu naftochinonic substituit cu un radical metil. Vitamina K_1 este levogiră şi prezintă o fluorescenţă roşie caracteristică care, sub acţiunea razelor ultraviolete, trece ireversibil în verde intens. Vitaminele K se descompun, de asemenea, la cald, în soluţii alcaline.

Filochinona este un ulei galben, foarte sensibil faţă de lumină şi alcalii. Lipsa de vitamina K provoacă tulburări în coagularea sângelui. În organismul mamiferelor, vitamina K este produsă de flora intestinală. Astfel, organismul este permanent aprovizionat cu vitamina K.

Absorbţia vitaminelor K_1 şi K_2 naturale se face împreună cu lipidele, după care acestea trec în sânge pe cale limfatică şi, de aici, în ficat. Vitaminele K sintetice sunt solubile în apă şi, de aceea, se absorb în absenţa sărurilor biliare.



Vitaminele K_2, produse de bacterii, se mai numesc şi menachinone-4, -6, -7, sau -9, după numărul resturilor de izopren din catena laterală.



Vitamine K_2 (menachinone-n)

Cea mai mare cantitate de vitamină K se depozitează temporar în ficat; vitamina K_3 nu se acumulează, excesul fiind eliminat prin glucurono- sau sulfo-conjugare.

Menadiona (K_3) este alchilată trecând în K_2 şi sub această formă îşi exercită funcţiile metabolice.

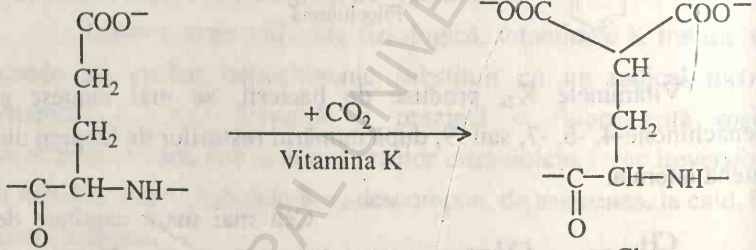
Rol metabolic. Vitamina K este un component al sistemului microzomial de transport de electroni cuplat cu gama-carboxilarea

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

post tranziţională a restului glutamil din unele proteine din plasmă, os (osteocalcina), rinichi, splină, inclusiv a proteinelor precursoare pentru factorii coagulării; protrombina (factorul II), proconvertina (factorul VII), factorul Christmas (factorul IX), factorul Stuart (factor X).

Proteinele coagulării sunt sintetizate în ficat sub formă de precursori inactivi.

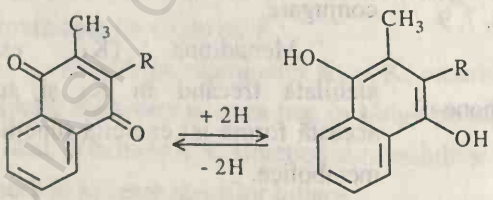
Vitamina K este importantă pentru sinteza protrombinei normale şi a factorilor VII, IX, X. Pentru ca aceşti factori să fie transformaţi în formele biologic active este necesară carboxilarea post-transcripţională a restului glutamil din precursori la acid γ-carboxil-glutamic.



Glu
Acid glutamic

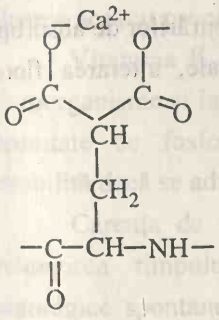
Gla
Acid γ-carboxi glutamic

Vitamina K, prin grupa 1,4-naftochinonă, joacă rol de transportor de hidrogen fiind coenzimă în procesul carboxilării.



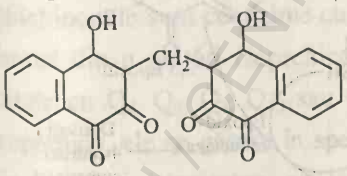
Vitamina K are rol catalitic în carboxilarea restului de acid glutamic la acidul γ-carboxi-glutamic.

Protrombina are 10 resturi de acid γ-carboxi-glutamic grupate la extremitatea N-terminală. Resturile de carboxil au o mare afinitate de chelatare a ionilor de calciu care servesc la legarea fosfolipidelor cu protrombina, interacțiune specifică pentru activarea protrombinei la trombină (factorul activ al coagulării).

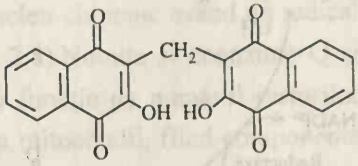


Grupele carboxilice ale acidului γ-carboxi-glutamic (Gla) rezidual din proteinele factorilor implicați în coagularea sângelui chelatează ionii de calciu.

Funcția principala a vitaminei K este de coenzimă pentru carboxilaze, enzimele care formează acidul γ-carboxi-glutamic din acidul glutamic. Reacțiile de carboxilare au loc în microzomii multor țesuturi în prezența O_2, CO_2 și formei de hidrochinonă a vitaminei K. În microzomii hepatici are loc "ciclul vitaminei K" (fig. 2.7). 2,3-Epoxidul format constituie substratul și sub acțiunea epoxid reductazei, care utilizează drept reducător un compus endogen cu grupe –SH, este transformat în chinonă.



Dicumarolul



Diftiocolul

Această etapă este sensibilă la agenții 4-hidroxi cumarinici fiind ținta acestor anticoagulanți, dintre care mai importanți sunt dicumarolul și diftiocolul. Aceștia acționează printr-un mecanism comun, constând în inhibarea biosintezei factorilor de coagulare sintetizați în ficat.

Acțiunea anticoagulantă se datorează concurenței acestor substanțe cu vitaminele K pentru partea apoenzimatică a sistemului implicat în biosinteza protrombinei.

Antivitaminele K, anticoagulante, se pot administra atunci când există pericolul coagulării sângelui în vasele sanguine (tromboze).

Carența de vitamina K se instalează în cazul tulburărilor de absorbție de lipide (deficit de bilă), afecțiuni intestinale, alterarea florei intestinale, afecțiuni hepatice, boli infecțioase.

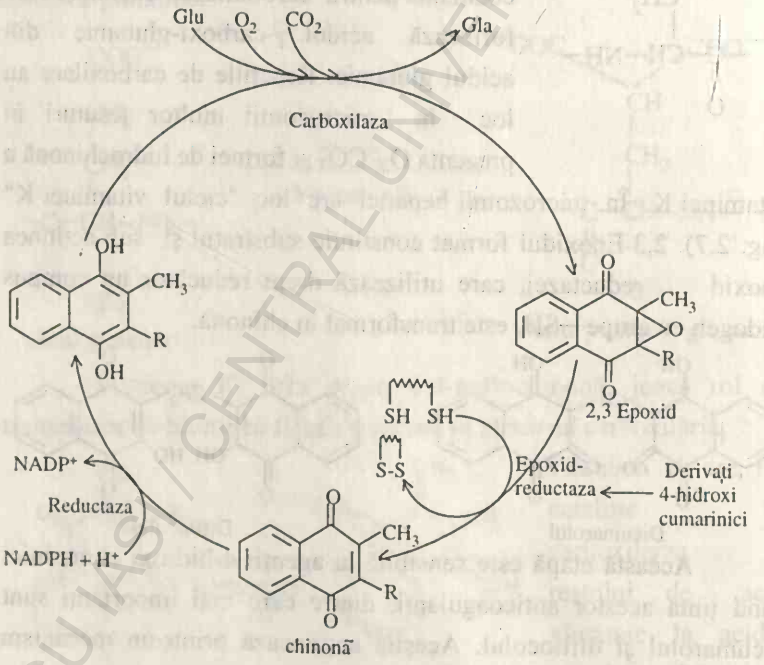


Fig. 2.7 Ciclul vitaminei K

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina K este implicată în transportul de electroni şi în fosforilarea oxidativă din mitocondrii. Locul specific de acţiune al vitaminei K este între NADH şi citocromul b. Se presupune că fosfatul cu care este esterificată forma redusă a vitaminei K poate fi transferat ADP-ului, cu formarea de ATP. Rolul acestei vitamine în fosforilarea oxidativă este reliefat de nevoia de vitamină K pentru reluarea acestui proces în extractele bacteriene iradiate.

Vitamina K este necesară fosforilării fotosintetice în unele microorganisme şi în plante. Dacă sunt iradiate cu raze UV posedă o capacitate de fosforilare oxidativă redusă, care poate fi însă restabilită dacă se adaugă vitamina K.

Carenţa de vitamina K determină scăderea protrombinei, prelungirea timpului de coagulare şi apariţia de fenomene hemoragice spontane. În perioada imediat postnatală, nou născuţii sunt predispuşi la hemoragii deoarece se nasc fără rezerve de vitamina K, având intestinul steril.

Ubichinone

Ubichinonele sunt coenzime cu un nucleu chinonic având un radical format din n unităţi izoprenice (fig. 2.8).Numite şi coenzime Q şi notate cu Q_4, Q_6, Q_8, Q_{10} sau Q_{12}, în funcţie de numărul resturilor izoprenice, ele se găsesc în special în mitocondii, fiind componente ale lanţului respirator şi îndeplinind funcţia de transport al hidroenului de la flavinenzime la sistemul citocromic.

În celulele vegetale există coenzima Q_{254} (notată astfel deoarece absoarbe intens la 254 nm) care se numeşte şi plastochinonă, cu o structură asemănătoare (fig. 2.9).

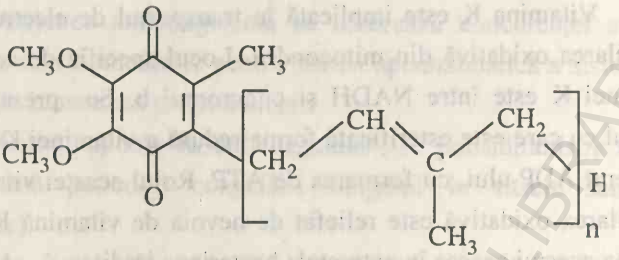
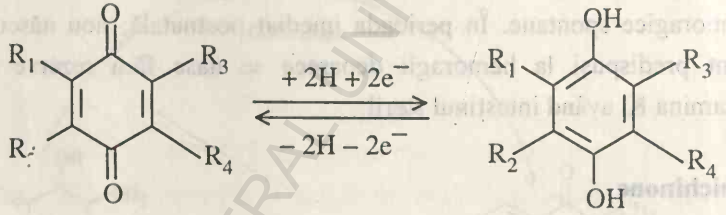


Fig. 2.8. Ubichinonele sau coenzimele Q

Reacțiile de oxido-reducere la care participă aceste specii se desfășoară în fază neapoasă, iar măsurătorile la 275 nm au permis stabilirea următorului mecanism de reacție:



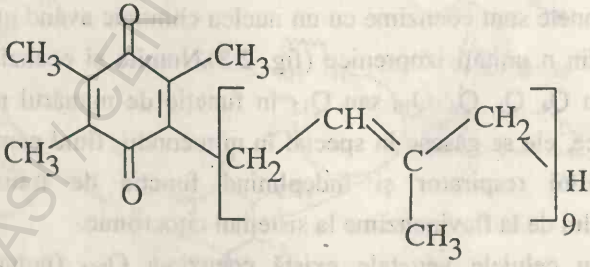


Fig. 2.9. Plastochinona sau coenzima Q_{254}

BCU IAȘI - CENTRALĂ UNIVERSITARĂ - BIBLIOTECA

Acizi graşi esenţiali

Absenţa câtorva acizi graşi nesaturaţi produce o varietate de simptome ce pot fi înlăturate prin adăugarea acestor compuşi în hrană. La şobolan, aceste simptome se sunt încetarea creşterii, necroza cozii, degenerarea organelor sexuale, hematurie, descuamarea pielii etc. Cantităţi de ordinul 20-100 mg/zi de acid linoleic (acid 9,12-octadecadienoic), acid arahidonic (acid 5,8,11,14-eicosatetraenoic)sau acid γ-linolenic (acid 6,9,12-octadecatrienoic) sunt suficiente pentru ameliorarea sănătăţii animalelor (fig. 2.10).Bacteriile nu conţin acizi graşi polinesaturaţi.Acizii linoleic şi linolenic nu pot fi sintetizaţi în corpul animal, în timp ce acidul arahidonic este sintetizat prin adiţia acetatului la un precursor cu 18 atomi de carbon.

$CH_3(CH_2)_4CH{=}\overset{12}{C}H{-}CH_2CH{=}\overset{9}{C}H{-}(CH_2)_7COOH$ Acid linoleic

$CH_3CH_2CH{=}\overset{15}{C}HCH_2CH{=}\overset{12}{C}H{-}CH_2CH{=}\overset{9}{C}H(CH_2)_7COOH$ Acid α–linolenic

$CH_3(CH_2)_4CH{=}\overset{12}{C}H{-}CH_2CH{=}\overset{9}{C}H{-}CH_2CH{=}\overset{6}{C}H(CH_2)_4COOH$ Acid γ–linolenic

$CH_3(CH_2)_4CH{=}\overset{14}{C}H{-}CH_2CH{=}\overset{11}{C}H{-}CH_2CH{=}\overset{8}{C}H{-}CH_2CH{=}\overset{5}{C}H(CH_2)_3COOH$ Acid arahidonic

Rolul acizilor graşi polinesaturaţi. Simptomele principale ale deficienţei acestor acizi sunt creşterea consumului de apă, oprirea creşterii, o viteză crescută a metabolismului. Activitatea crescută a citocromoxidazei din ficatul şobolanilor hrăniţi cu diete carenţate în acizi graşi polinesaturaţi sugerează că aceştia ar avea un rol în fosforilarea oxidativă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

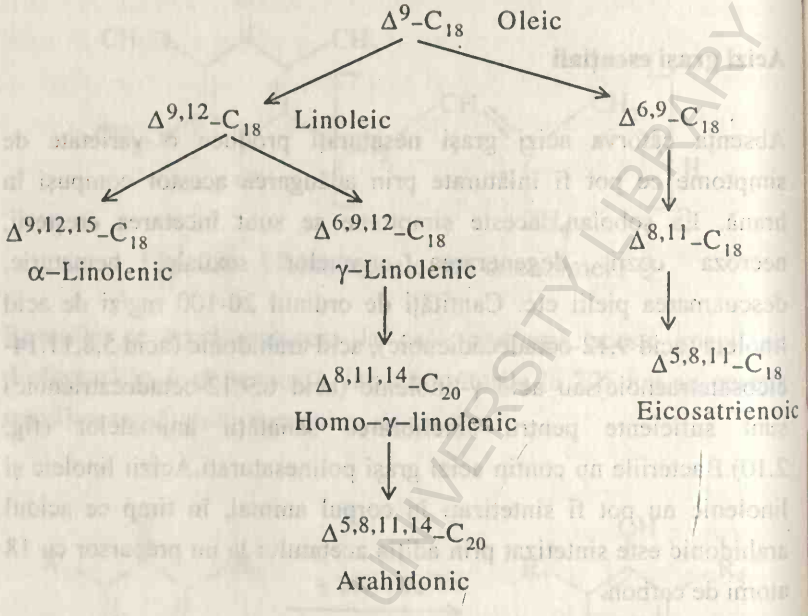


Fig. 2.10. Biosinteza acizilor grasi polinesaturati

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAP. III. ENZIME

Mare parte din cercetările de biochimie s-au concentrat asupra studiului enzimelor. Primele investigații asupra enzimelor din stomac au fost făcute încă din perioada 1780 – 1825. În anul 1833, Payen și Persoz demonstrează prezența unui principiu activ în extractele de orz germinat, care realizează hidroliza amidonului, pe care l-au numit diastază. Mai târziu, Louis Pasteur a arătat că fermentația zaharurilor la alcool este catalizată de fermenții din drojdia de bere. Termenul de ferment a fost introdus datorită fierberii aparente prin degajarea de CO_2 în timpul fermentației (lat. "ferveo" = a fierbe = ferment). În 1860 s-a postulat faptul că acest ferment sau enzimă are o structură specifică și este produs de celulele vii de drojdie. În 1897, E. Büchner demonstrează că această importantă enzimă poate funcționa independent de structura celulară, fiind activă și în preparatele acelulare.

Prima enzimă izolată în stare cristalizată a fost ureaza, care, în 1926, a fost extrasă de către J. B. Sumner dintr-un material vegetal. Cu această ocazie s-a stabilit natura proteică a enzimelor.

De-abia în deceniul al treilea al secolului XX, J. Northrop reușește să izoleze în stare cristalină pepsina, tripsina și chimotripsina. Astăzi se cunosc peste 1500 enzime, unele izolate în stare pură, cristalizată.

Enzimele sunt catalizatori de natură proteică. Substanța asupra căreia acționează enzima se numește *substrat*. Compusul sau compușii care se formează poartă numele de *produs (produși) de reacție*. Unele enzime sunt asociate cu compuși cu mase moleculare mici, dializabili. Dacă acești compuși organici sunt puternic legați în

structura enzimei, ei se numesc *grupări prostetice*, iar dacă formează o combinație ușor disociabilă, poartă denumirea de *coenzime.* Componenta proteică se numește *apoenzimă.*

Datorită naturii lor proteice, enzimele posedă toate însușirile fizico-chimice, specifice acestor macromolecule (solubilitate, proprietăți osmotice, sarcina electrică netă, denaturare termică, reacții chimice ș.a.).

Enzimele sunt catalizatori și, deci, respectă legile catalizei:

– accelerează viteza reacțiilor chimice care sunt posibile termodinamic, determinând scăderea energiei de activare și conducând la o mai rapidă instalare a stării de echilibru;

– acționează în cantități extrem de reduse asupra unor mari cantități de substrat;

– la sfârșitul reacțiilor chimice se regăsesc neschimbate, putând participa la noi reacții.

Cataliza enzimatică se deosebește de cea chimică prin *eficiența sa superioară (număr de turnover* sporit), prin *parametrii optimi de acțiune ai enzimei* (pot fi inactivate de temperaturi înalte, în mediu alcalin sau acid etc.) și prin *înalta lor specificitate de acțiune.*

Există mai multe tipuri de specificitate:

Specificitate de reacție. O hidrolază catalizează o reacție de hidroliză, iar o transferază numai o reacție de transfer de grupe etc. Sunt puține cazuri în care o enzimă catalizează două tipuri de reacții, datorită a două zone distincte responsabile fiecare pentru un anumit tip de specificitate de reacție.

Specificitate de substrat. Unele enzime acționează asupra unui singur substrat, altele asupra unor substanțe apropiate ca

structură chimică. Ureaza posedă specificitate absolută de substrat.

Specificitate absolută de grup. Unele enzime acționează asupra unui grup de substrate înrudite chimic. De pildă, enzima *acetil-CoA sintetaza* catalizează reacția următoare, în care acidul acetic poate fi înlocuit cu acid propionic sau acrilic. Lactatul, piruvatul, succinatul, malatul, salicilatul nu pot substitui acetatul în această reacție.

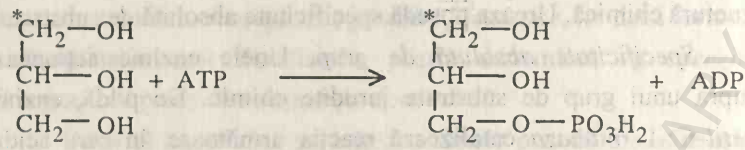
$$ATP + Acid\ acetic + CoA{-}SH \longrightarrow AMP + PPa + Acetil \sim CoA$$

Specificitatea relativă de grup se referă la acțiunea enzimelor asupra unor anumite legături chimice din molecula substratului, fiind neafectate de natura restului moleculei acestuia. Fosfataza catalizează hidroliza unui mare număr de esteri ai acidului fosforic, în calitate de substrat fiind atât esterii fosforici ai alcoolilor primari și secundari, ai unor alcooli ciclici, cât și esterii fosforici ai glucidelor, mononucleotidelor etc.

Stereospecificitate de substrat și de reacție. Enzimele atacă molecule aparținând fie seriei L, fie seriei D. Lactat dehidrogenaza din mușchi atacă acidul L-lactic, în timp ce enzima izolată din microorganisme transformă acidul D-lactic în acid piruvic.

Dacă se formează un produs de reacție optic activ dintr-un substrat simetric, atunci se obține numai un singur izomer optic. Dacă substratul are configurație *cis*, enzima nu atacă izomerul *trans* și invers.

S-a dovedit, cu substrate marcate cu izotopi radioactivi, că unele enzime pot face distincția între două grupe chimic identice. De pildă, enzima *glicerolkinaza* fosforilează asimetric glicerolul, realizând esterificarea unei singure grupe de alcool primar, întotdeauna aceeași:



Nomenclatura şi clasificarea enzimelor

Comisia pentru enzime a Uniunii Internaţionale de Biochimie (UIB) a stabilit un sistem de clasificare zecimală care ţine seama de reacţia catalizată şi de natura substratului şi serveşte atât pentru clasificare, cât şi pentru nomenclatură. Fiecare enzimă este notată cu un număr de cod format din patru cifre, număr care permite identificarea enzimelor, a substratului asupra caruia acţionează şi a reacţiei catalizate.

Enzimele sunt grupate în şase clase:

1. *Oxidoreductaze* – catalizează reacţii de transfer de electroni;

2. *Transferaze* – catalizează transferul de grupări funcţionale de pe un substrat (donor) pe alt substrat (acceptor);

3. *Hidrolaze* – produc scindarea în prezenţa apei (hidroliză);

4. *Liaze* – reacţii de adiţie la dubla legătură sau îndepărtarea unor grupe de atomi;

5. *Ligaze* (sintetaze) – unirea a două molecule (formare de noi legături) cu energia cedată prin hidroliza ATP.

A doua cifră a numărului de cod defineşte subclasa şi se referă la tipul grupei din molecula substratului asupra căreia acţionează enzima.

A treia cifră indică gruparea transferată sau natura acceptorului.

A patra cifră reprezintă numărul de ordine a enzimei în subclasa respectivă.

Exemple:

1.Oxidoreductaze

1.1 acționează asupra grupelor CH–OH ca donor de hidrogen

1.1.1. cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

1.1.99 cu alți acceptori

.....

3. *Hidrolaze*

3.4 acționează asupra legăturii peptidice

3.4.13 Dipeptid hidrolaze

3.4.99 Proteinaze cu mecanism catalitic necunoscut

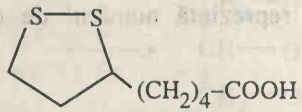
Pe lângă această denumire științifică a enzimei, se utilizează o denumire uzuală, în acord cu numele științific. De pildă, *Alcool:NAD–oxidoreductaza* (EC 1.1.1.1.) se numește și *alcool:NAD-oxidoreductaza* sau, curent, *alcool dehidrogenaza* (ADH).

1.Oxidoreductaze

Această clasă conține enzime care catalizează reacțiile de oxidoreducere dintre doi compuși prin transferul electronilor de la un donor (agent reducător) la un acceptor (agent oxidant):

$$S_{redus} + S'_{oxidat} \longrightarrow S_{oxidat} + S'_{redus}$$

Deoarece transferul electronilor se face concomitent cu cel al protonilor, reacția poartă numele de dehidrogenare, și este echivalentă cu reacția de oxidare, iar hidrogenarea este echivalentă cu reducerea. Transportul de hidrogen se face de către coenzimă. Principalele coenzime cu rol în oxidoreducere sunt coenzimele piridinice (NAD^+ și $NADP^+$), coenzimele flavinice (FMN și FAD), citocromii și acidul lipoic.

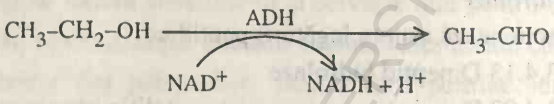


Acidul lipoic

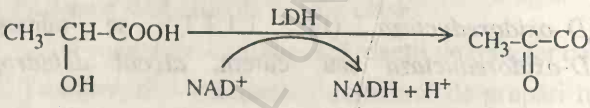
Oxidoreductazele catalizează oxidoreducerea grupelor: –CH–OH; $–CH_2–CH_2–$; –CH–NH_2; –CH = NH.

1.1. Oxidoreductaze care acționează asupra grupelor >CH–OH ale donorilor.

1.1.1.1 Alcool:NAD–oxidoreductaza (alcool-dehidrogenaza):



1.1.1.27. L – Lactat:NAD^+– oxidoreductaza (lactat dehidrogenaza):



1.4. Enzime cu acțiune asupra grupei >CH–NH_2 ca donor de electroni.

1.4.13. *L-Glutamat:$NAD(P)^+$–oxidoreductaza* (*glutamat dehidroge-naza*):

$$\text{L-Glutamat} + H_2O + NAD(P)^+ \xrightarrow{\text{GlDH}} \alpha\text{–Cetoglutarat} + NH_4^+ + NAD(P)H + H^+$$

1.11. Enzime ce acționează asupra H_2O_2 ca acceptor de electroni.

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H_2O$$

1.11.1.6. H_2O_2:H_2O_2–oxidoreductaza (catalaza):

În această subclasă se încadrează și peroxidaza denumită

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

donor: H_2O_2 oxidoreductaza (EC 1.11.1.7) care catalizează reacții de tipul:

$$DH_2 + H_2O_2 \longrightarrow D + 2\,H_2O$$

2. *Transferaze.*

Acestea catalizează reacțiile de transfer a unor grupe de pe un substrat pe altul:

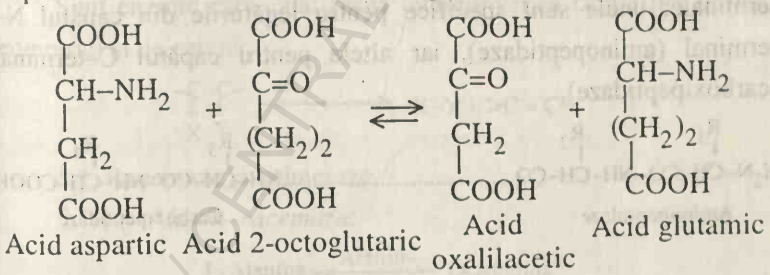
$$S_1{-}G + S_2 \rightleftharpoons S_2{-}G + S_1$$

Grupele transferate pot avea un singur atom de carbon, pot fi resturi de aldehide, cetone, acil, alchil, glicozil, amino, fosfat, sulfat.

$$\text{Glucoza} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{HK} \text{ADP} + \text{G–6–P}$$

2.7.1.1. *ATP–D–hexozo–6–fosfotransferaza (hexokinaza)*

În această subclasă se încadrează și binecunoscutele aminotransferaze, GOT și GPT, *L-aspartat:2-oxoglutarat aminotransferaza* și *L-alanin: 2-oxoglutarat aminotransferaza* care catalizează reacțiile de transfer a grupei amino de la acidul aspartic, respectiv de la alanină la acidul 2-cetoglutaric:



Acid aspartic Acid 2-octoglutaric Acid oxalilacetic Acid glutamic

3. *Hidrolaze*

Sunt enzime care catalizează ruperea unor legături organice cu participarea apei, conform reacției:

$$A{-}B + H_2O \rightleftharpoons AH + BOH$$

BCU "I. Creangă" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Legăturile hidrolizate pot fi legături esterice, eterice, peptidice, anhidride, C–N, C–X, P–N. În această clasă nu se găsesc coenzime. Ele necesită însă prezența unor ioni metalici pentru activare. Din această clasă fac parte enzimele digestive.

3.1. Esterazele catalizează scindarea legăturii esterice: carboxiesteraze, tioesteraze, fosfoesteraze, sulfoesteraze.

3.1.1.8. Acetilcolin–acilhidrolaza (pseudocolin–esteraza):

$$CH_3–CO–O–CH_2–CH_2–N(CH_3)_3 \xrightarrow{+H_2O} CH_3–COOH + HO–CH_2–CH_2–N(CH_3)_3$$

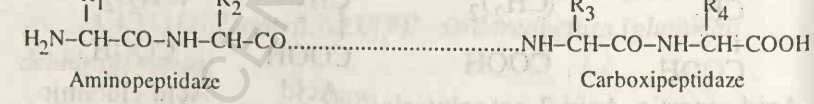
Ligaza este un exemplu de esterază, cu denumirea sistemică *glicerol: ester hidrolaza* (EC 3.1.1.3), care catalizează reacția:

$$\text{Triacilglicerol} + H_2O \longrightarrow \text{Diacilglicerol} + \text{Acid gras}$$

Totodată, această clasă cuprinde şi amilazele, enzime care catalizează desfacerea legăturilor glicozidice din polizaharide (3.2.1).

3.4. Enzime ce catalizează hidroliza peptidelor.

– *exopeptidazele* acționează asupra legăturii peptidice terminale; unele sunt specifice pentru legăturile din capătul N–terminal (aminopeptidaze), iar altele pentru capătul C–terminal (carboxipeptidaze).



– *endopeptidazele* scindează legăturile peptidice situate în mijlocul lanțurilor peptidice; acestea sunt peptidazele propriu-zise: pepsina, tripsina, chimotripsina, catepsina.

4. *Liazele.* Acestea catalizează ruperea legăturilor dintre doi atomi din molecula substratului fără participarea apei. Această clasă include enzimele care acționează asupra legăturilor C–C, C–O, C–N,

C–S, C–X. Această clasă se subîmparte în C–C liaze, C–N liaze, C–S liaze etc. De exemplu, izocitrat glioxilat liază (EC 4.1.3.1) catalizează reacția:

$$\underset{\text{Acid izocitric}}{HOOC\text{-}CH_2\text{-}CHCOOHCHOHCOOH} \rightleftharpoons \underset{\text{Acid succinic}}{HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2COOH} + \underset{\text{Acid glioxilic}}{O=CH\text{-}COOH}$$

4.1.2. Aldehid–liaze.

4.1.2.7. *Cetozo–1–fosfat–aldehid–liaza* (*aldolaza*) scindează legătura C–C din fructoză fosforilată:

$$\underset{\text{1,6-difosfat}}{\text{Fructozo-}} \xrightarrow{Aldolaza} \underset{\text{fosfat}}{\text{Dihidroxiaceton-}} + \underset{\text{-3-fosfat}}{\text{Glicerin-aldehid-}}$$

4.2. Carbon-oxigen-liaze

4.2.1.2. *L-Malat-hidroliaza* (*fumaraza*):

$$\text{L-Malat} \longrightarrow \text{Fumarat} + H_2O$$

5. *Izomeraze*

Sunt enzime care catalizează interconversia izomerilor optici, geometrici şi de catenă.

$$\begin{array}{c} -C-C- \\ \quad | \quad | \\ \quad X \quad Y \end{array} \longrightarrow X-Y + >C=C<$$

5.1. Racemaze şi epimeraze

5.1.1.1. *Alanin–racemaza*:

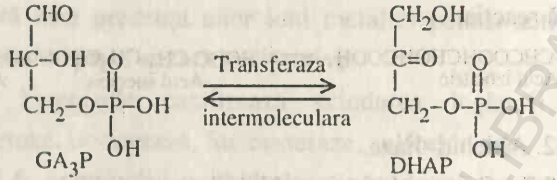
$$\text{L-Alanina} \xleftarrow[\text{racemaza}]{\text{Alanin-}} \text{D-Alanina}$$

5.2. Cis-trans-izomeraze

5.2.1.3. *All-trans-retinol:11-cis-trans-izomeraza* (retinen-izomeraza):

$$\text{All–trans–retinol} \rightleftharpoons \text{11–cis–retinol}$$

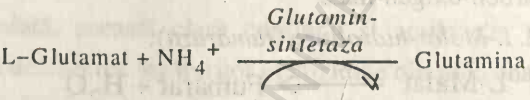
5.3. Enzime care catalizează interconversiunea aldozelor şi cetozelor:



6. *Ligaze.* Aceste enzime catalizează legarea a doi compuşi, cuplată cu ruperea unei molecule de ATP. Se realizează legături C–O, C–S, C–N, C–C.

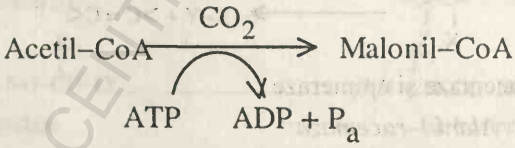
6.3. Enzime care catalizează formarea legăturii C–N.

6.3.1.2. *L-Glutamat + amoniac–ligaza* (ADP) (*glutamin-sintetaza*):



6.4. Enzime care catalizează formarea legăturii C–C

6.4.1.2. *Acetil–CoA: CO_2 – ligaza* (ADP) (*acetil–CoA–carboxilaza*)



Structura enzimelor

Din edificiul molecular al enzimei, numai o mică porţiune este responsabilă pentru recunoaşterea structurii stereochimice a substratului, pentru legarea lui şi pentru iniţierea şi realizarea

BUCUREŞTI / CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

propriu-zisă a catalizei. Această regiune se numeşte *centru activ* sau *situs catalitic activ*. De exemplu: centrul activ al chimotripsinei este constituit din His-57, Asp-102 şi Ser-195, grupate într-o zonă cu un diametru de aproximativ 20 Å, ca urmare a plierii macromoleculei proteice.

Rolul centrului activ este de a "identifica" substratul, de a-l lega sub forma unui complex enzimă-substrat şi de a realiza actul catalitic în urma căruia rezultă produşii reacţiei enzimatice şi se eliberează catalizatorul într-o stare chimică neschimbată. Centrul activ poate "recunoaşte" substratul, deoarece cele 2 entităţi au stereochimii complementare.

Specificitatea mare a unei enzime este strâns legată de structura ei fizică şi chimică specifică. Din punct de vedere chimic, o enzimă este formată dintr-o parte proteică – *apoenzima* – şi o parte neproteică – *coenzima* sau *cofactor*.

Partea proteică este termolabilă, iar coenzima este termostabilă şi dializabilă.

Apoenzima. Enzimele simple şi apoproteinele enzimelor complexe sunt formate din catene lungi polipeptidice, având aceleaşi nivele de organizare structurală ca şi alte proteine: primară, secundară, terţiară şi cuaternară.

Coenzime. Frecvent, coenzimele conţin în structura lor vitamine din grupul B. Astfel, vitamina B_6 participă la reacţiile metabolice ale aminoacizilor, vitamina PP, vitamina B_1, B_2, acidul pantotenic şi acidul lipoic participă la reacţiile de oxidoreducere, iar acidul folic şi vitamina B_{12} intervin în metabolismul fragmentelor de un atom de C.

Coenzimele sunt considerate ca al doilea substrat pentru enzimă sau cosubstrat.

După tăria legăturilor dintre apoenzimă şi cofactor, deosebim:

– grupări prostetice – care sunt molecule organice fixate pe apoenzimă şi care disociază greu. Gruparea prostetică determină mecanismul după care se desfăşoară unele procese enzimatice, cum ar fi: transportul de hidrogen, de electroni, de grupări $-NH_2$, $-CH_3$, acetil.

– coenzimele se separă de apoenzimă prin dializă şi trec uşor de la o apoenzimă la alta. Dintre acestea fac parte: NAD^+, $NADP^+$, $NADH + H^+$, $NADPH + H^+$, ATP, CTP, FMN, FAD, acidul lipoic etc.

– cofactori anorganici reprezentaţi de ioni ai diferitelor metale (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) care sunt indispensabili activităţii metal-enzimei. Aceşti ioni metalici sunt introduşi în cantităţi mici prin alimentaţie.

Coenzimele pot fi clasificate după tipul reacţiei la care participă în două categorii:

A. Coenzime ce participă la transferul hidrogenului:

1. Coenzimele piridinice (NAD^+, $NADP^+$)
2. Coenzimele flavinice (FMN, FAD)
3. Acidul lipoic
4. Coenzima Q

B. Coenzime care participă la transportul de grupări (altele decât H):

1. Glucide fosforilate
2. CoA-SH
3. Tiamin pirofosfat (TPP)
4. Piridoxal–5–fosfat
5. Acizii folinici
6. Biotina
7. Coenzimele vitaminei B_{12}
8. Acidul lipoic

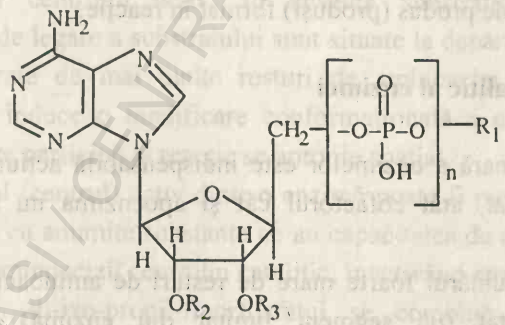
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se constată că în structura multor coenzime intră AMP, de aceea aceste coenzime pot fi considerate derivați ai AMP care diferă în privința substituenților R_1; R_2; R_3 și a numărului de grupări fosfat legate la carbonul 5' din riboză.

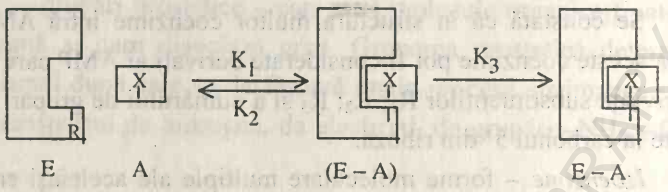
Izoenzime – forme moleculare multiple ale aceleiași enzime. Ele catalizează aceeași reacție enzimatică, dar diferă între ele în privința proprietăților fizice, chimice și imunologice.

Stereospecificitatea își găsește o aplicație directă în studiul centrului activ al enzimelor sub numele de marcaj de afinitate.

Metoda constă în formarea unui complex între enzimă și un analog steric al substratului pe care se grefează o funcție chimică reactivă. Analogul se comportă ca un inhibitor competitiv. Inițial, se formează un complex reversibil între enzimă și analogul A (E–A), după care, printr-o reacție chimică ireversibilă între funcția X a analogului A și aminoacidul R din centrul activ al enzimei, se formează un complex E–A legat covalent.



După proteoliza enzimei modificate, se poate identifica aminoacidul care a reacționat cu analogul.



Metoda permite identificarea aminoacizilor din centrul activ care intervin fie în recunoaşterea substratului, fie în mecanismul catalitic. Cromatografia de afinitate este o aplicaţie directă a specificităţii enzimatice.

Cinetica reacţiilor enzimatice

Studiul cineticii enzimatice permite cunoaşterea mecanismelor, înţelegerea şi clasificarea proceselor metabolice şi importanţa lor fiziologică pentru organism. Măsurarea activităţii enzimatice se reduce la studiul cineticii sau vitezei reacţiei catalizate care reprezintă, în general, cantitatea de substrat transformată în unitate de timp sau de produs (produşi) format în reacţie.

Centrul catalitic al enzimei

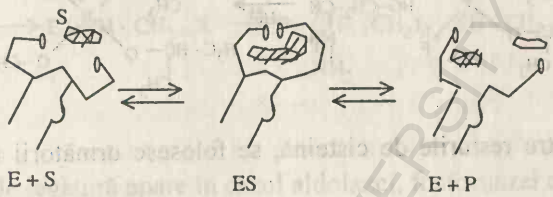
Structura binară a enzimelor este indispensabilă acţiunii catalitice. Luate separat, atât cofactorul cât şi apoenzima nu au activitate catalitică.

Din numărul foarte mare de resturi de aminoacizi numai un număr limitat (un segment limitat din enzimă) participă la interacţiunea cu substratul. Pe această porţiune există grupări funcţionale capabile să atragă şi să fixeze molecula substratului într-o poziţie privilegiată şi într-un loc (situs) strict determinat.

Ansamblul acestor grupări chimice funcționale alcătuiesc centrul catalitic al enzimei.

Uneori centrul catalitic este reprezentat de unele catene laterale ale lanțurilor peptidice din structura enzimei.

Reacția enzimatică poate fi concepută ca având loc în două etape: formarea complexului enzimă-substrat, urmată de modificarea substratului și desprinderea produsului de reacție de pe enzimă.

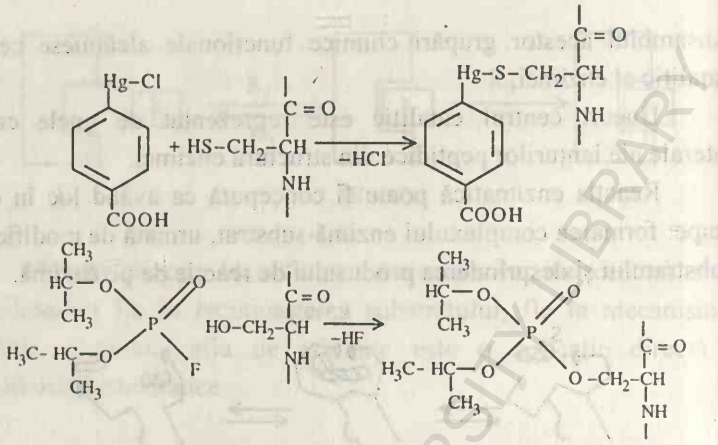


Inițial, centrul catalitic a fost conceput ca un tipar rigid, preformat, substratul potrivindu-se în enzimă ca și cheia în broască. Un model mai perfecționat este cel imaginat de Koshland, numit "fixare indusă". Principala caracteristică a acestui model este flexibilitatea centrului activ. În absența substratului, grupele catalitice și de legare a substratului sunt situate la depărtare unele de altele, separate de mai multe resturi de aminoacizi. Apropierea substratului induce o modificare conformațională a enzimei încât grupările care participă la reacție se apropie spațial.

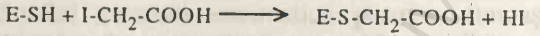
Situsul (centrul) activ dintr-o enzimă poate fi pus în evidență prin tratarea cu anumite substanțe ce au capacitatea de a se combina specific cu aminoacizii centrului catalitic, inactivând enzima.

Astfel, di-izo-propil-fluorfosfatul se combină specific cu serina din centrul activ al majorității hidrolazelor (ex. colinesteraza).

Para-clor-mercuribenzoatul se combină specific cu resturile de cisteină, aflate în centrul activ al majorității dehidrogenazelor, blocând astfel reacțiile metabolice catalizate de acestea.

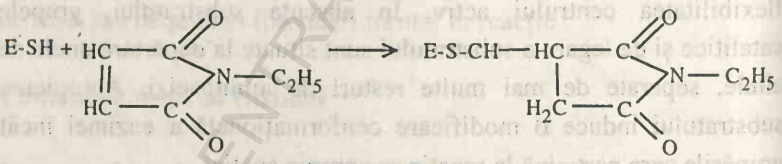


Pentru resturile de cisteină, se folosesc următorii reactivi de grup:



Acid iodacetic

Iodacetamida



N - Etilmaleimida

Deşi multe enzime au grupări SH, unele nu se găsesc în centrul activ şi, deci, reacţia cu reactivii de grup nu determină dimunuarea activităţii enzimatice. Aldolaza conţine 10 astfel de grupe situate în afara centrului activ.

Ideal ar fi ca substratul să permită identificarea centrului activ. Legătura dintre acestea fiind labilă, nu permite, după hidroliză

identificarea grupărilor care au asigurat fixarea. De aceea, se măreşte stabilitatea complexului E–S prin tratamente chimice. Astfel, enzimele cu un rest de lizină în centrul activ reacţionează cu substratul cu funcţii carbonil pentru a forma o bază Schiff:

$$E\text{-}NH_2 + O{=}CH\text{-}X \xrightarrow[-H_2O]{} E\text{-}N{=}CH\text{-}X \xrightarrow{NaBH_4}$$

$$\longrightarrow E\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}X \xrightarrow{H^+} \underset{\displaystyle NH_2}{\overset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{CH}}}}\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}X$$

Acest tip de legătură apare în cazul aldolazei, fosforilazei etc.

Derivaţii arsenului se combină cu resturile de cisteină ceea ce explică şi toxicitatea arsenicului.

Grupările tiol pot fi deblocate cu ditioglicerol, utilizat în medicină ca antidot în intoxicaţiile cu metale grele.

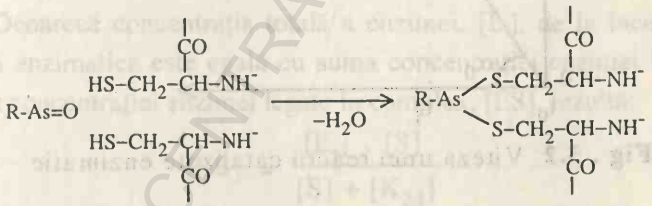


Fig. 3.1 Efectul toxic al compuşilor cu arsen

Viteza reacţiei enzimatice

Enzimele modifică viteza reacţiilor asupra cărora acţionează. Pentru o reacţie de tipul A $\longrightarrow$ P viteza de reacţie se defineşte ca fiind

raportul dintre cantitatea de substanță A şi intervalul t, în care aceasta se transformă în produsul P.

Viteza de reacție poate fi exprimată şi în funcție de concentrația produsului de reacție ($v = dP/dt$). Dacă se reprezintă grafic cantitatea de substrat transformată în produs, în unitatea de timp, se obține o curbă care are o parte rectilinie în care viteza este constantă şi una curbă în care viteza scade pentru ca în final să devină nulă. Prima parte a curbei indică viteza inițială a reacției v_0, definită prin panta maximă a curbei (unghiul dintre abscisă şi tangenta la curbă) $v_0 = tg\ \alpha_0$. Viteza reacției (v) la un timp dat (t) este egală cu dP/dt. Pentru a cunoaşte viteza este suficient să se măsoare unghiul pe care îl face tangenta la curbă la timpul t.

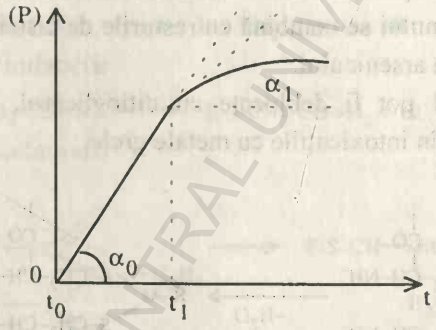


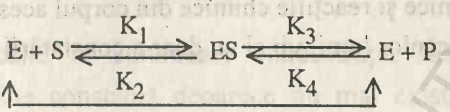
Fig . 3.2 Viteza unei reacții catalizate enzimatic

Tangenta la origine dă viteza inițială a reacției, v_0. Viteza de reacție este influențată de concentrația enzimei, concentrația substratului, temperatura, pH, agenți redox, presiune, radiații, etc.

Pentru toate enzimele este valabilă relația $v = k[E]$ unde v este viteza reacției enzimatice; k – constantă de proporționalitate; [E] – concentrația enzimei în mediul de reacție.

La baza cineticii enzimatice stă ideea existenței unui complex enzimă–substrat, numit și complex Michaelis-Menten, deosebit de reactiv.

Se poate presupune că, în orice moment al unei reacții enzimatice, vitezele de formare și de scindare ale complexului ES sunt aproximativ egale, încât concentrația complexului ES poate fi considerată constantă. Din ecuația:



rezultă: $k_1[E][S] + k_4[K][P] = k_2[ES] + k_3[ES]$

Inițial, [P] este neglijabilă și se poate simplifica: $K_1[E][S] = [ES](k_2 + k_3)$; rezultă că:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M$$

se obține astfel o constantă cinetică, numită *constantă Michaelis*, care definește afinitatea enzimei pentru un anumit substrat.

Deoarece concentrația totală a enzimei, $[E_t]$, de la începutul reacției enzimatice este egală cu suma concentrației enzimei libere [E] și a concentrației enzimei legate în complex, [ES], rezultă:

$$[ES] = \frac{[E_t] \cdot [S]}{[S] + [K_M]}$$

Din relațiile $v = k_3[ES]$ și $v_{max} = k_3[E_t]$ reiese că:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Aceasta este relația Michaelis-Menten.

Trebuie să observăm că enzimele sunt substanțe complexe, cu rol catalitic produse de organismul viu pentru a dirija transformările

chimice în direcția necesară acestuia. Ele sunt asemănătoare cu catalizatorii obișnuiți de origine minerală, prin activitatea pe care o pot desfășura. Aceasta sugerează posibilitatea de abordare a fenomenelor lumii vii dintr-o altă perspectivă, nu pur și simplu de la simplu la complex, cum este cazul cu cercetările actuale, ci de la esența, necesitățile și scopurile plantei, animalului sau omului spre procesele biochimice și reacțiile chimice din corpul acestora, în ideea înțelegerii fenomenelor lumii vii și nu doar a constatării lor.

Influența concentrației enzimei

Pentru concentrații crescânde de enzimă, cantitatea de substrat transformat în unitatea de timp crește proporțional cu concentrația enzimei numai pentru un interval de timp și numai pentru porțiunea rectilinie a curbei.

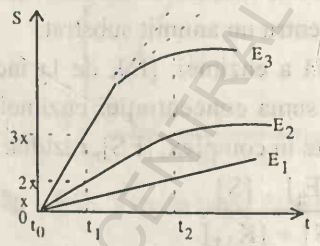
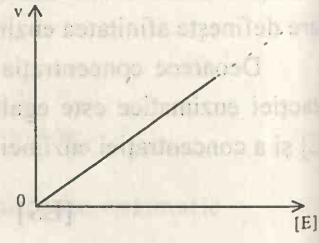


Fig. 3.3 Cinetica unei reacții enzimatice în prezența unor concentrații crescute de enzimă



Variația vitezei reacției enzimatice în funcție de concentrația în enzimă

Dacă într-un preparat biologic se formează x mg P într-un timp dat iar în alt preparat, în același timp se formează 2x mg P, înseamnă că acesta conține de două ori mai multă enzimă care catalizează formarea unui produs P.

Influența concentrației substratului

Dacă se menține constantă concentrația de enzimă și se mărește concentrația de substrat S, viteza crește rapid până la o valoare limită (v_{max}). Dacă S continuă să crească curba capătă o inflexiune și pentru valori mari pentru S viteza nu mai crește, curba tinde asimptotic către v_{max}.

Crescând în continuare concentrația substratului, viteza reacției rămâne constantă deoarece nu mai există enzimă liberă. Transformarea substratului în produs de reacție are loc cu formarea, pentru scurt timp, a unui complex enzimă-substrat.

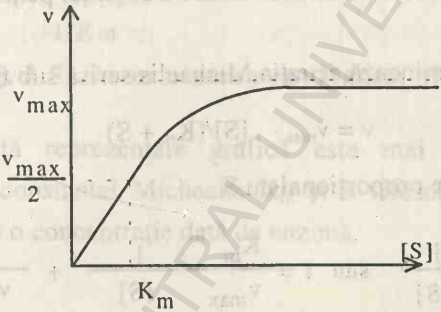
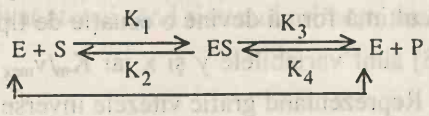


Fig. 3.4 Influenta concentratiei substratului asupra vitezei de reactie

Existența sa a fost dovedită prin spectroscopie UV și VIS, RMN, fluorescență sau prin dializă. Reacția de bază care descrie cataliza enzimatică este:



BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În aceste condiții, cantitatea de produs P depinde direct de concentrația complexului ES. Dacă S continuă să crească, ES nu va crește decât până la o valoare maximă care depinde de cantitatea de enzimă disponibilă E devine factor limitant al formării complexului ES.

S-a calculat constanta Michaelis a reacției sau constanta de echilibru a disocierii complexului ES care este egală cu concentrația substratului pentru care viteza este egală cu jumătate din valoarea vitezei maxime, $K_m = [S]$. În general, valorile K_m sunt cuprinse între 10^{-2} M și 10^{-8} M.

K_m este o măsură a afinității enzimei pentru substratul său. O valoare mică a K_m indică o afinitate mare a enzimei pentru substrat și invers.

Dacă se examinează ecuația Michaelis scrisă sub forma:

$$v = v_{max} \cdot [S]/(K_m + S)$$

se observă că v este proporțional cu S.

$$v = \frac{v_{max}\,[S]}{K_m + [S]} \quad \text{sau} \quad 1 = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

În cataliza enzimatică se disting două etape: formarea complexului ES care implică reacunoașterea substratului de către centrul activ al enzimei, etapă caracterizată prin $K_m = [E] \cdot [S]/[ES]$ și o a doua etapă care este descompunerea complexului ES caracterizată de v_{max}. S-a încercat o liniarizare a ecuației Michaelis. Scrisă sub această ultimă formă devine o ecuație de tipul $y = ax + b$, în care $1/v$ și $1/[S]$ sunt variabilele y și x iar K_m/v_{max} și $1/v_{max}$ sunt constantele a și b. Reprezentând grafic vitezele inverse $1/v$ în funcție

de 1/[S] se obține o dreaptă care taie axa ordonatelor în punctul $1/v_{max}$, iar axa absciselor în punctul $-1/K_m$, așa cum reiese din figura alăturată.

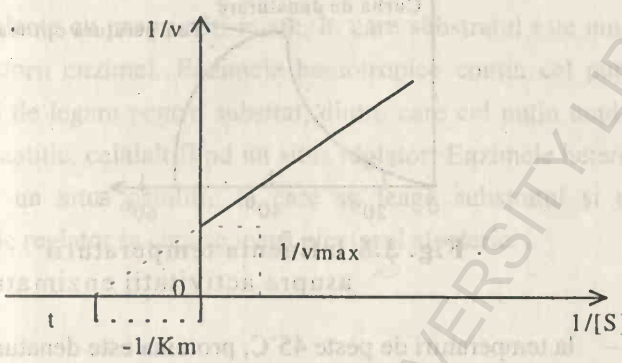


Fig. 3.5 Determinarea constantei Michaelis

Această reprezentare grafică este mai comodă pentru determinarea constantei Michaelis K_m și a vitezei maxime v_{max} a reacției pentru o concentrație dată de enzimă.

Influența temperaturii

Viteza de reacție crește cu creșterea temperaturii, în anumite limite:

– la temperaturi mici 0-40°C viteza crește proporțional cu temperatura. Această creștere se explică prin creșterea concentrației complexului activat atunci când sistemul primește mai multă energie;

BCU "MIHAI EMINESCU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

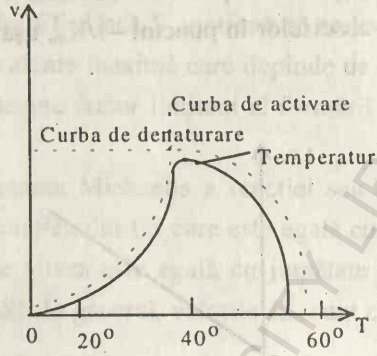


Fig. 3.6 Influența temperaturii asupra activității enzimatice

– la temperaturi de peste 45°C, proteina este denaturată.

Temperatura optimă este temperatura la care cele două fenomene se găsesc în echilibru.

Enzime alosterice

Caracteristica principală a enzimelor alosterice este susceptibilitatea lor de a fi inhibate de alți metaboliți decât substratele naturale. Metaboliții se numesc efectori alosterici sau modulatori alosterici (pozitivi sau negativi, dacă provoacă mărirea activității catalitice și, respectiv, dacă o micșorează). De pildă, fosforilarea glucozei este inhibată specific în hemolizatele de eritrocite de către fosfoglicerat.

Există trei clase de enzime alosterice: enzime homotropice, la care substratul îndeplinește pe lângă rolul de substanță a cărei transformare o catalizează enzima respectivă și rolul de modulator

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

accelerând viteza de reacție în funcție de concentrația lui în mediu; enzime heterotropice, la care cinetica este afectată de prezența unei substanțe efector sau modulator, alta decât substratul natural și enzime homotropic-heterotropice, care sunt enzime reglatorii multivalente cu proprietăți mixte, în care substratul este unul dintre modulatorii enzimei. Enzimele homotropice conțin cel puțin două situsuri de legare pentru substrat, dintre care cel puțin unul este un situs catalitic, celălalt fiind un situs reglator. Enzimele heterotropice posedă un situs catalitic la care se leagă substratul și un situs alosteric reglator la care se leagă efectorul alosteric.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAP. IV. GLUCIDE

Se mai numesc hidraţi de carbon datorită formulei $C_n(H_2O)_n$, ceea ce presupune că ar putea fi descompuse în C şi H_2O (Schmidt, 1844). Faptul că prin încălzire aceştia eliberează apă şi se carbonizează justifică denumirea lor de hidraţi de carbon. În prezent se numesc glucide sau zaharuri şi sunt polihidroxi-aldehide şi polihidroxi-cetone din punct de vedere chimic.

Importanţa biologică a glucidelor este legată de larga lor răspândire în natură şi de funcţiile pe care le îndeplinesc:

— sursă directă de energie pentru aproape toate celulele organismului. Celulele creierului şi eritrocitele sunt total dependente energetic de glucoză.

— substanţe de rezervă, amidonul şi glicogenul;

— funcţia de susţinere — celuloza pentru plante, chitina care serveşte drept schelet exterior pentru multe nevertebrate şi polizaharidele din ţesutul conjunctiv pentru animalele superioare;

— funcţii specifice — monozaharidele intră în componenţa epiteliilor, mucoaselor, în substanţele specifice de grup sanguin, în unele substanţe cu rol în coagulare (heparina), sau îndeplinesc rol în reacţiile de apărare ale organismului.

Proteinele sunt specifice regnului animal, iar glucidele celui vegetal.

Clasificare

1. Monozaharide sau zaharuri simple, sunt compuşi care nu pot fi hidrolizate în forme mai simple. Ele se împart în trioze, tetroze,

pentoze, hexoze, heptoze şi octoze, după numărul de atomi de carbon, iar după grupa aldehidică sau cetonică, în aldoze şi cetoze.

2. Dizaharide — glucide ce pot fi hidrolizate în două monozaharide: zaharoza, lactoza, maltoza.

3. Oligozaharide — conţin 3-6 resturi monozaharidice. Maltotrioza conţine trei resturi de α-glucoză.

4. Polizaharidele conţin mai mult de 6 resturi de monozaharide.

Izomerie

Moleculele monozaharidelor conţin unul sau mai mulţi (n) atomi de carbon asimetrici, de unde rezultă 2^n izomeri optici sau stereoizomeri. Glucoza are 4 atomi de carbon asimetrici, va forma $2^4 = 16$ stereoizomeri, în timp ce fructoza, cu 3 C asimetrici, formează numai $2^3 = 8$ stereoizomeri.

În raport cu configuraţia C asimetric din glicerin aldehida, o monozaharidă oarecare poate aparţine seriei sterice D sau L. Dacă grupa —OH de la ultimul atom asimetric se găseşte în dreapta ca în D-gliceralddehidă, atunci monozaharida va aparţine seriei D. Dacă grupa —OH se află în stânga, monozaharida aparţine seriei L. Majoritatea zaharurilor care pot fi metabolizate în organismele animale aparţin seriei D.

Prezenţa carbonilor asimetrici conferă monozaharidelor activitate optică, dextrogiră (+) pentru cele care rotesc planul luminii polarizate spre dreapta şi levogiră (—) pentru cele care îl rotesc spre stânga.

Glucoza naturală, activă biologic este D(+)-glucoza, iar fructoza este D(—)-fructoză, pentru care se mai numeşte şi levuloză. Când există cantităţi egale de izomeri + şi — rezultă un amestec optic inactiv, numit amestec racemic sau amestec ±.

Enantiomerii sunt stereoizomeri ce diferă prin configuraţia tuturor atomilor de carbon asimetrici. Sinteza de laborator conduce la formarea de cantităţi egale din cei doi enantiomeri (racemic), în timp ce sinteza enzimatică determină apariţia unuia sau altuia dintre enantiomeri.

Diastereoizomerii diferă prin configuraţia a maximum n-1 C asimetrici. Diastereoizomerii care diferă prin configuraţia unui singur C asimetric se numesc epimeri. Aceştia se deosebesc prin proprietăţile fizice, chimice şi valoarea unghiului sau sensului de rotaţie.

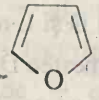
Structura ciclică

Grupa —C=O poate fi atacată nucleofil de către grupa OH din poziţia 4, 5 sau 6 cu formarea unui compus de adiţie intramoleculară, numit semiacetal. Iau naştere astfel cicluri de 5 sau 6 atomi, favorizate energetic de lipsa de tensiune dintre legături (unghiurile sunt $109^{o}28'$ în cazul ciclurilor de 6 atomi şi de 108°, în cazul ciclurilor de 5 atomi).

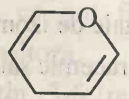
Ciclurile de 5 atomi se numesc furanozice, iar cele de 6 atomi, piranozice, datorită asemănării lor cu furanul şi, respectiv, piranul.

Glucoza şi fructoza pot exista în ambele forme , însă una dintre ele poate fi favorizată. De pildă, glucoza, în soluţie apoasă, se

găseşte în proporţie de 99% în forma piranozică şi numai 1% sub formă furanozică.

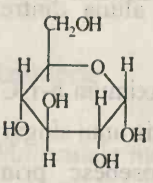


Furan

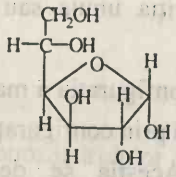


Piran

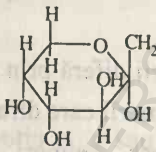
Fructoza se găseşte mai ales sub formă furanozică.



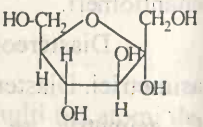
α–D-Gluco-piranoza



α–D-gluco-furanoza



α–D-fructo-piranoza

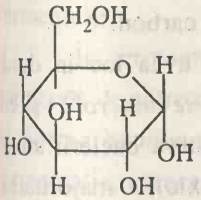


α–D-fructo-furanoza

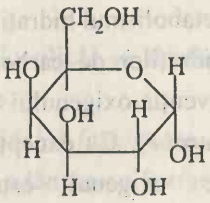
Anomerie. Prin ciclizare între C_1 şi C_5, se formează un semiacetal al glucozei, iar în cazul fructozei între C_2 şi C_5, când apare un nou atom de carbon asimetric, care poate avea două configuraţii spaţiale, dând naştere la două forme anomere: anomerul α, dacă grupele OH de la C_1 şi C_4 se găsesc de aceeaşi parte a planului ciclului şi anomerul β, dacă aceste grupe se găsesc de o parte şi de alta a planului.

În stare cristalină glucoza este α-D-glucopiranoză. În soluţie, se află 36% α-D-glucopiranoză, 63% β-D-glucopiranoză şi numai 1% α- şi β-D-glucofuranoză. O foarte mică cantitate de glucoză rămâne deschisă, aciclică.

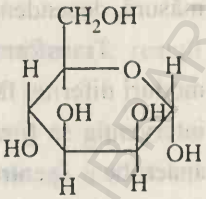
Epimerie. Hexozele sunt izomeri ai glucopiranozei care diferă prin configuraţia C_2, C_3 şi C_4. Aceşti izomeri se numesc epimeri.



α–D-Gluco-piranoza



α–D-Galactozo-piranoza



α–D-Manozo-piranoza

Transformări biochimice ale monozaharidelor

Totalitatea reacţiilor chimice din organismele vii formează metabolismul acestora. Metabolismul cuprinde *procesele catabolice*, caracterizate prin reacţii în care substanţe cu structură relativ complicată cum sunt hidraţii de carbon, proteinele şi grăsimile (principalele componente ale alimentelor) sunt transformate în substanţe mai simple şi *procesele anabolice* în care se sintetizează substanţe cu structuri complicate, pornind de la molecule mai simple.

Procesele catabolice sunt în general însoţite de eliberare de energie. Procesele anabolice sunt consumatoare de energie.

Biochimia are rolul de a cerceta transformările chimice din celulele vii, în ansamblul lor. Chimia organică este interesată mai ales de cunoaşterea substanţelor ce apar în celulele vii. Ea studiază "static" aceste substanţe, a căror existenţă o constată şi pe care le caracterizează din punct de vedere chimic, în timp ce biochimia este interesată de procesele la care iau parte aceste substanţe.

Transformările catabolice şi anabolice ale hidraţilor de carbon se află în centrul activităţii biochimice din celulele vii.

Sintezele şi degradările proteinelor şi ale grăsimilor sunt, în mar măsură, dependente de metabolismul hidraţilor de carbon.

Transformările hidraţilor de carbon pot avea loc în dou moduri diferite: fără intervenţia oxigenului (*procese anaerobe*) şi c intervenţia sa (*procese aerobe*). Cu excepţia câtorva bacterii stric anaerobe (pentru care oxigenul este toxic), majoritate microorganismelor pot trăi atât în condiţii aerobe, oxidând comple substanţele alimentare, cât şi în condiţii anaerobe, în care caz produ degradări mai puţin avansate acestor substanţe.

Animalele nu pot trăi decât în condiţii aerobe. Unele ţesutur animale pot vieţui însă şi în condiţii anaerobe trecătoare. De pildă, î muşchi, după un exerciţiu intens, consumul de oxigen depăşeşt aportul normal pe calea circulaţiei sanguine. Procesele anaerobe di muşchi pot fi studiate experimental, izolând muşchiul şi provocân contracţiile sale în afara organismului sau mărunţindu-l şi studiin acţiunea terciului asupra diferitelor substraturi. Studii similare s-au făcut şi cu ţesuturi din alte organe (ficat, creier etc.).

Fermentaţia alcoolică

În acest proces, o moleculă de hexoză, capabilă să fermenteze dizolvată în apă, suferă o descompunere în bioxid de carbon şi alcoo etilic, conform ecuaţiei descoperite de Gay-Lussac:

$$C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

Fermentaţia este provocată de organismele microscopice di drojdie (*Saccharomyces cerevisiae*), larg răspândite în natură Pasteur (1857) a observat că o soluţie de zahăr, sterilizată prin

încălzire şi izolată de atmosferă, poate fi ţinută indefinit fără să fermenteze.

În fermentaţia alcoolică, se desfăşoară următoarele reacţii catalizate de către enzime:

a) *Formarea monozaharidelor fosforilate*. Din soluţii de glucoză în fermentaţie, cărora li s-a adăugat un fosfat anorganic, au fost izolaţi unii esteri ai acidului fosforic (fig. 4.1). Se formează mai întâi 6-fosfatul de D-glucopiranoză (esterul lui Robison, I); acesta trece în 6-fosfat de D-fructofuranoză (esterul lui Neuberg, II), care se transformă în 1,6-difosfatul de D-fructofuranoză (esterul Harden şi Young, III). Prima reacţie este catalizată de către hexokinază şi are loc cu participarea unei molecule de ATP care furnizează restul fosfat. Reacţia nu ar fi termodinamic posibilă, fără participarea ATP-ului, datorită energiei libere pozitive ($\Delta G^{o'}$= + 3,3 kcal/mol). Transferul fosfatului de molecula ATP şi formarea legăturii esterice este favorabilă energetic, întrucât se eliberează $\Delta G^{o'}$= –4,0 kcal/mol ($\Delta G^{o'}$= – 7,3 kcal/mol, pentru hidroliza ATP).

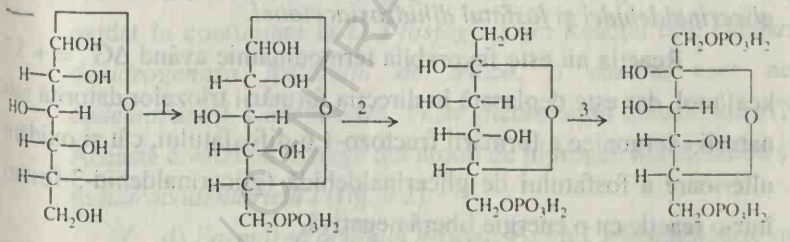


Fig. 4.1. Primele reactii biochimice din procesul fermentatiei alcoolice

În *reacţia 1*, funcţia de coenzimă este îndeplinită astfel de *acidul adenozin-trifosforic* (ATP), care poate transfera un rest de

fosfat la D-glucoză, transformându-se în acid adenozin-difosforic (ADP).

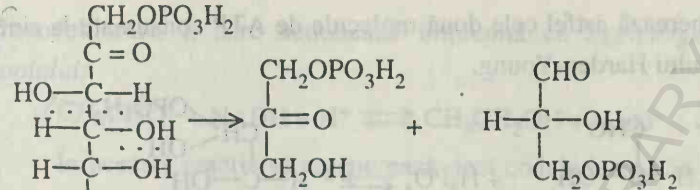
Reacția 2 este catalizată de o *oxo-izomerază*, numită *fosfogluco-izomerază*. Mecanismul reacției presupune formarea unui intermediar endiol legat de enzimă ce poate fi convertit rapid la forma *ceto* sau *aldo* a zahărului respectiv. Izomerizarea nu implică un schimb important de energie liberă, astfel încât reacția este practic reversibilă $\Delta G^{o'} = + 0,4$ kcal/mol.

În *reacția 3* are loc transferul unui rest de fosfat, de la o a doua moleculă de ATP la compusul II, sub acțiunea enzimei *fosfofructo-kinazei*. Enzima necesită magneziu în această reacție și este reglată alosteric, fiind încetinită de către ADP și AMP. Din nou diferența de energie liberă, $\Delta G^{o'} = - 3,4$ kcal/mol, face ca reacția spre dreapta să fie ireversibilă.

b) *Decondensarea aldolică*. 1,6-Difosfatul de fructofuranoză suferă, sub acțiunea enzimei *aldolază*, o rupere a moleculei prin care se formează esterii fosforici ai celor două trioze: *fosfatul D-gliceralnaldehidei* și *fosfatul dihidroxiacetonei*.

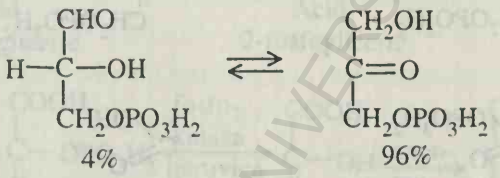
Reacția nu este favorabilă termodinamic având $\Delta G^{o'} = + 5,7$ kcal/mol, dar este deplasată în direcția formării triozelor datorită atât naturii exergonice a formării fructozo-1,6-difosfatului, cât și oxidării ulterioare a fosfatului de gliceralnaldehidă (gliceralnaldehid-3-fosfat) într-o reacție cu o energie liberă negativă.

În continuare, participă la formarea alcoolului numai fosfatul gliceralnaldehidei. Fosfatul dihidroxiacetonei este însă izomerizat la fosfatul gliceralnaldehidei, sub acțiunea *izomerazei fosfaților de trioze*.



Esterul Harden-Young, III — Fosfatul dihidroxiacetonei — Fosfatul D-gliceraldehidei

Aceste două substanțe pot fi izolate, când se lucrează în anumite condiții.



4% — 96%

Echilibrul este deplasat spre dreapta, deoarece $\Delta G^{0'} = -1{,}8$ kcal/mol. Intermediar se formează un endiol.

c) *Formarea acidului D-fosfogliceric.* Fosfatul glicerinaldehidei este oxidat în continuare la *D-3-fosfogliceric.* Reacția este catalizată de *dehidrogenaza fosfatului de trioză*, o enzimă care necesită *codehidrază I.* Codehidraza I este nicotinamid-dinucleotida (NAD). Această coenzimă extrage doi atomi de hidrogen din aldehidă și trece în *hidrocodehidrază I* (fig. 4.2).

d) *Formarea acidului piruvic.* Acidul 3-fosfogliceric suferă o serie de transformări, trecând în acid piruvic.

Defosforilarea acidului fosfo-enol-piruvic, are loc prin intervenția (alături de fosfokinaza piruvică) a acidului adenozin-difosforic, ADP, care trece în acid adenozin-trifosforic. Se

regenerează astfel cele două molecule de ATP consumate la sinteza esterului Harden-Young.

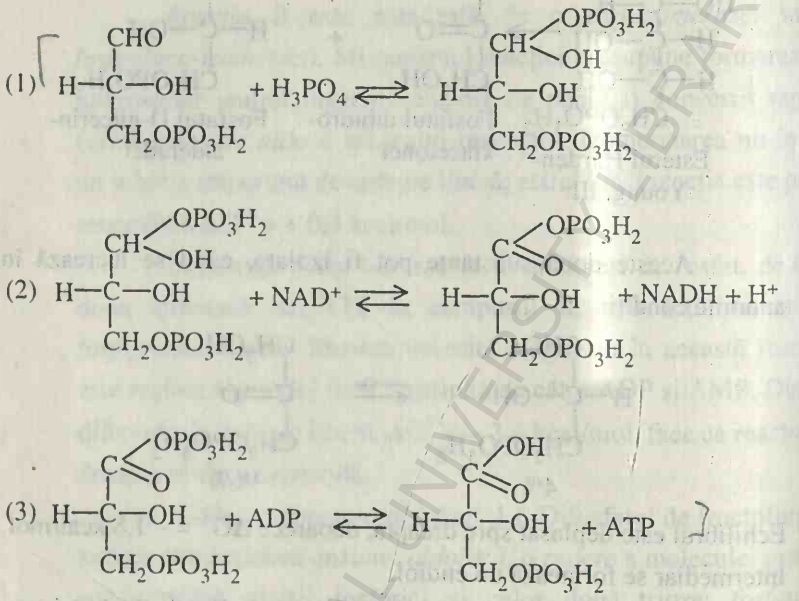


Fig. 4.2. Formarea acidului fosfogliceric
în procesul fermentatiei alcoolice

e) *Formarea etanolului.* Acidul piruvic este primul derivat nefosforilat din întreg lanțul de reacții *a-d.* Sub influența enzimei *carboxilază*, care are drept coenzimă pirofosfatul vitaminei B_1, acesta se transformă în acetaldehidă:

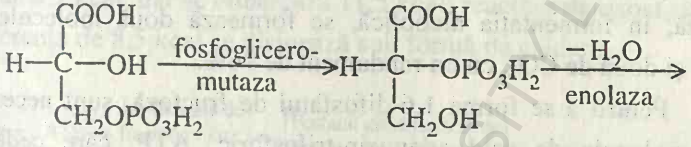
$$CH_3COCOOH \longrightarrow CH_3CHO + CO_2$$

Bioxidul de carbon se degajă liber în fermentația alcoolică, iar acetaldehida este hidrogenată la alcool prin hidrogenul cedat de

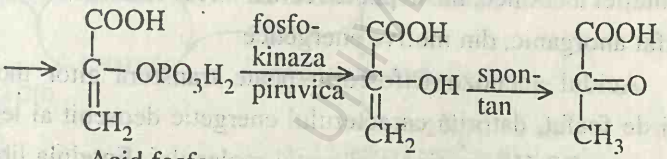
hidrocodehidraza I, care acționează împreună cu *dehidrogenaza alcoolului:*

$$CH_3CHO + NADH + H^+ \rightleftarrows CH_3CH_2OH + NAD^+$$

În această reacție se regenerează deci codehidraza I în stare oxidată.

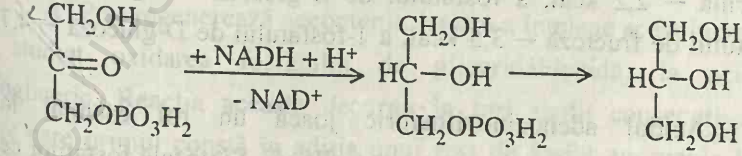


Acid 3-fosfogliceric — Acid 2-fosfogliceric



Acid fosfo-enol-piruvic — Acid enol-piruvic — Acid piruvic

f) *Procese secundare.* Alături de etanol se mai formează 2-3% glicerină. Aceasta se formează la începutul procesului fermentativ, când concentrația acetaldehidei este insuficientă pentru a accepta tot hidrogenul hidrocodehidrazei. În acest stadiu funcționează ca acceptor de hidrogen fosfatul dihidroxiacetonei, care trece astfel în *acid glicerinfosforic* și apoi în glicerină:

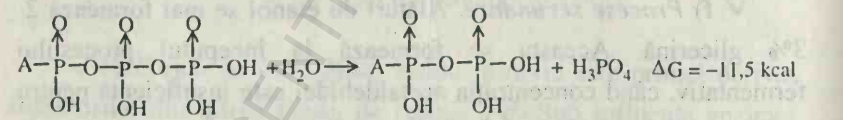


Dacă se adaugă sulfit de sodiu în soluția de zahăr supusă fermentației, acetaldehida este blocată sub formă de combinație bisulfitică și întregul proces decurge altfel: dintr-un mol de glucoză rezultă un mol de glicerină, unul de CO_2 și un mol de acetaldehidă (sub formă de combinație bisulfitică).

√ g) *Bilanțul de materiale și de energie.* Dintr-o moleculă de glucoză, în fermentația alcoolică, se formează două molecule de etanol și două de CO_2, cu un randament de 96%.

Pentru a se forma 1,6-difosfatul de fructoză, sunt necesare două molecule de acid adenozin-trifosforic, ATP, care cedează fiecare câte un rest de fosfat moleculei de hexoză. În procesul fermentației alcoolice, nu se poate realiza direct esterificarea hexozei cu fosfat anorganic, din motive energetice.

Acidul adenozin-trifosforic poate transfera altor molecule resturi de fosfat, datorită caracterului energetic deosebit al legăturii dintre grupa PO_3H_2 marginale și restul moleculei. Entalpia liberă de reacție la hidroliza acidului adenozin-trifosforic, are o valoare negativă deosebit de mare:



Reacțiile de hidroliză ale altor esteri de acid fosforic decurg cu degajare de energie mult mai mică: hidroliza 1-fosfatului de glicerină — 2,2 kcal, a fosfatului de D-glucoză — 3,0 kcal, a 6-fosfatului de fructoză — 3,5 kcal, a 1-fosfatului de D-glucoză — 4,7 kcal.

Acidul adenozin-trifosforic joacă un rol esențial în schimburile energetice din toate țesuturile vii. Sintezele fosfaților ce

apar ca intermediari în fermentații sunt reacții consumatoare de entalpie liberă (reacții endoergice; $\Delta G > 0$); acestea sunt posibile datorită energiei care se eliberează la desfacerea legăturii bogate în energie a acidului adenozin-trifosforic. De pildă, la formarea 6-fosfatului de D-glucoză prin transferul unui rest de fosfat de la ATP se consumă 3 kcal, dar se eliberează 11,5 kcal; reacția este exoergică, însă diferența de 8,5 kcal se disipează sub formă de căldură.

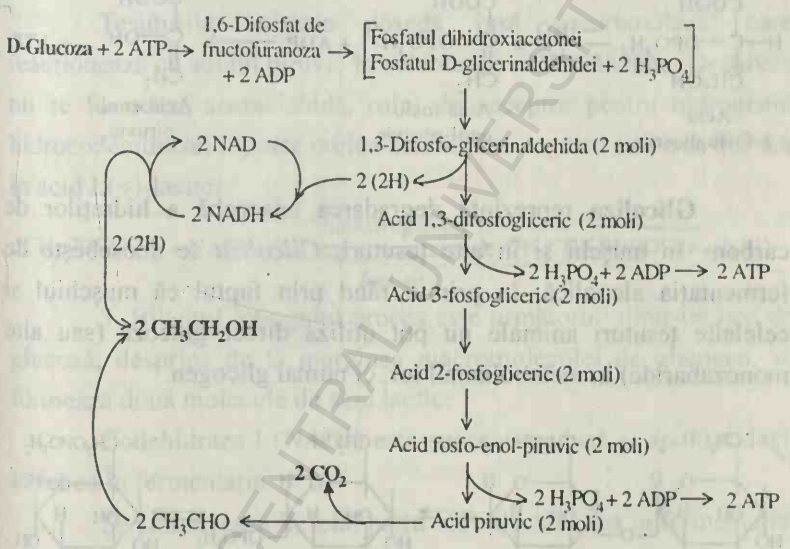
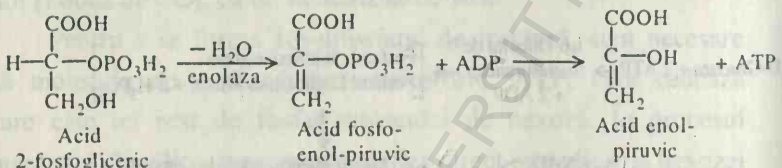


Fig. 4.3. Schema generala a fermentatiei alcoolice

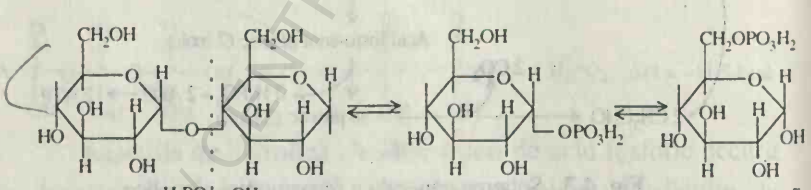
ATP se regenerează necontenit. Pentru a înțelege acest lucru, s-a studiat oxidarea fosfatului de glicerinaldehidă, la acid fosfogliceric. Reacția aceasta decurge în trei stadii consecutive, dintre care primul constă în adiția unui rest de fosfat anorganic la grupa aldehidică.

În cel de-al doilea stadiu (reacția puternic exoergică de transfer de hidrogen de la substrat la codehidrază), o parte din energia degajată rămâne înmagazinată în molecula acidului 1,3-difosfogliceric, sub forma unei legături de fosfat foarte bogată în energie ($\Delta G = -16{,}2$ kcal). Prin aceasta devine posibil transferul restului de fosfat, în stadiul al treilea al reacției și regenerarea unei molecule de ATP.



Acid 2-fosfogliceric — Acid fosfo-enol-piruvic — Acid enol-piruvic

Glicoliza reprezintă degradarea anaerobă a hidraților de carbon în mușchi și în alte țesuturi. *Glicoliza* se deosebește de fermentația alcoolică, în primul rând prin faptul că mușchiul și celelalte țesuturi animale nu pot utiliza direct glucoză (sau alte monozaharide) în metabolismul lor, ci numai glicogen.



Glicogen — 1-Fosfat de glucoză (Esterul lui Cori) — 6-Fosfat de glucoză (Esterul lui Robison)

Glicoliza care are loc la nivelul mușchiului începe prin detașarea unui rest de glucoză de la o margine a macromoleculei de glicogen sub acțiunea *fosforilazei din mușchi* și a fosfatului

anorganic. Restul de glucoză este astfel transformat în *1-fosfat de glucoză* (esterul lui Cori).

Sub acțiunea enzimei *fosfo-glucomutază,* 1-fosfatul este izomerizat în 6-fosfat de glucoză, care suferă în continuare aceleași transformări ca în fermentația alcoolică până se ajunge la acidul piruvic. De aici, reacția decurge diferit în țesuturile animale, deoarece acestea nu conțin *carboxilază.*

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CH_3COCOOH$$

Țesuturile animale posedă însă cocarboxilază, care reacționează cu acidul piruvic în colaborare cu alte enzime. Deoarece nu se formează acetaldehidă, rolul de acceptor pentru hidrogenul hidrocodehidrazei îl poate prelua acidul piruvic, care este transformat în acid L(+)-lactic:

$$CH_3COCOOH + NADH + H^+ \underset{\text{lactică}}{\overset{\text{dehidrogenaza}}{\rightleftharpoons}} CH_3CH(OH)COOH + NAD^+$$

3. Bilanțul întregului proces este următorul: dintr-un rest de glucoză, desprins de la marginea macromoleculei de glicogen, se formează două molecule de acid lactic:

Codehidraza I (NAD^+) este succesiv redusă și apoi oxidată, la fel ca în fermentație.

Se sintetizează în total patru moli de ATP, ca în fermentație, dar se consumă numai unul, deoarece formarea 1-fosfatului de glucoză, pornind de la glicogenul bogat în energie, utilizează acid fosforic anorganic. Trecerea glucozei în acid lactic aduce celulei trei molecule de ATP pentru fiecare moleculă de glucoză consumată. În aceste molecule rămâne înmagazinată o energie de 34,5 kcal, care servește organismului pentru funcțiile sale vitale, între altele pentru producere de lucru mecanic.

4. *Acidul lactic*, format în mușchii mamiferelor, este transportat pe calea sângelui în ficat, unde este retransformat în glicogen, prin parcurgerea tuturor reacțiilor glicolizei în sens invers și, desigur, cu un consum corespunzător de ATP (Cori).

Se pot observa asemănările și deosebirile dintre fermentația alcoolică și glicoliză în fig. 4.4.

Degradarea oxidativă a hidraților de carbon

1. În absența oxigenului, acidul piruvic, singurul acceptor posibil pentru hidrogenul hidrocodehidrazei I (NADH), trece în acid lactic regenerându-se codehidraza I. Această reacție este însă numai o resursă excepțională a organismului atunci când, în urma unui efort prelungit, mușchiul nu mai este alimentat cu suficient oxigen, dar mai dispune de rezerve de glicogen.

În prezența oxigenului, hidrocodehidraza I (NADH) transferă hidrogenul său oxigenului, servindu-se pentru aceasta de sistemul enzimelor și coenzimelor de respirație: diaforază, citocrom și citocrom-oxidază. În prezența oxigenului, acidul piruvic este oxidat complet la CO_2 și H_2O.

2. Acidul piruvic și alți ceto-acizi dau o reacție de *decarboxilare oxidativă*:

$$CH_3COCOOH + 1/2\ O_2 \longrightarrow CH_3COOH + CO_2$$

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

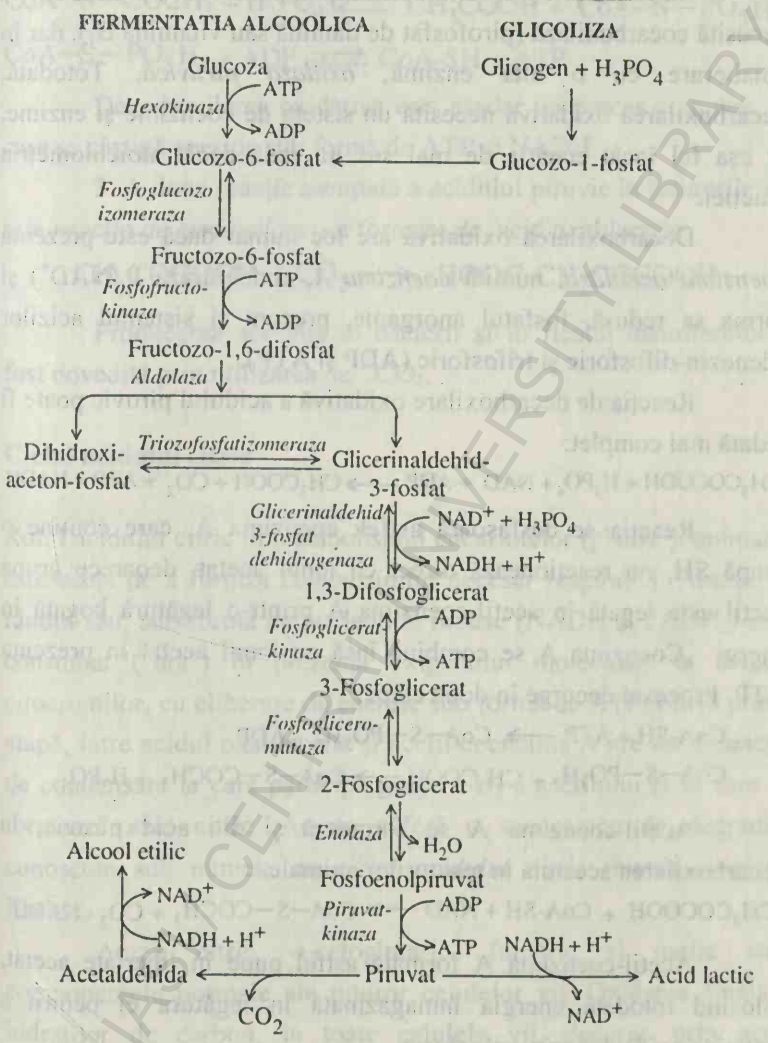


Fig. 4.4. Fermentatia alcoolica si glicoliza: asemanari si deosebiri

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La fel ca şi decarboxilarea simplă, anaerobă, această reacţie necesită cocarboxilază (pirofosfat de tiamină sau vitamină B_1), dar în colaborare cu o altă enzimă, *oxidaza piruvică*. Totodată, decarboxilarea oxidativă necesită un sistem de coenzime şi enzime, în aşa fel încât ecuaţia de mai sus nu redă decât stoichiometria reacţiei.

Decarboxilarea oxidativă are loc numai dacă este prezentă *coenzima acetilării,* numită *coenzima A*, codehidraza I (NAD^+) şi forma sa redusă, fosfatul anorganic, precum şi sistemul acizilor adenozin-difosforic şi trifosforic (ADP şi ATP).

Reacţia de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic poate fi redată mai complet:

$$CH_3COCOOH + H_3PO_4 + NAD + ADP \longrightarrow CH_3COOH + CO_2 + ATP + NADH$$

Reacţia se desfăşoară astfel: coenzima A, care conţine o grupă SH, nu reacţionează direct cu ionul acetat, deoarece grupa acetil este legată în acetil-coenzima A printr-o legătură bogată în energi . Coenzima A se combină însă cu ionul acetat în prezenţa ATP. Procesul decurge în două etape:

$$CoA\text{-}SH + ATP \longrightarrow CoA{-}S{-}PO_3H_2 + ADP$$

$$CoA{-}S{-}PO_3H_2 + CH_3COOH \longrightarrow CoA{-}S{-}COCH_3 + H_3PO_4$$

Acetil-coenzima A se formează şi din acid piruvic, la decarboxilarea acestuia în ţesuturilor animale.

$$CH_3COCOOH + CoA\text{-}SH + NAD \longrightarrow CoA{-}S{-}COCH_3 + CO_2 + NADH$$

Acetil-coenzima A formată astfel pune în libertate acetat, folosind totodată energia înmagazinată în legătura ei pentru a sintetiza acid adenozin-trifosforic:

$$CoA{-}S{-}COCH_3 + H_3PO_4 \rightleftarrows CH_3COOH + CoA{-}S{-}PO_3H_2$$

$$CoA{-}S{-}PO_3H_2 + ADP \rightleftarrows CoA\text{-}SH + ATP$$

Decarboxilarea oxidativă este aşadar un proces complex, în care se câştigă energie sub formă de ATP şi NADH.

3. A doua reacţie esenţială a acidului piruvic în ţesuturile vii este *reacţia de carboxilare*, cu formare de acid oxalilacetic:

$$CH_3COCOOH + CO_2 \longrightarrow HOOC\text{-}CH_2COCOOH$$

Producerea acesteia în bacterii şi în ficatul mamiferelor a fost dovedită prin utilizarea de $^{14}CO_2$.

Ciclul acidului citric

Rolul acidului citric în metabolismul eucariotelor (plante şi animale) este acela de a furniza *combustibilul* necesar respiraţiei. Acesta, la rândul său, sub formă de nucleotide reduse (NADH şi $FADH_2$) este consumat ("ars") în prezenţa oxigenului molecular, la nivelul citocromilor, cu eliberare de energie sub formă de ATP. Într-o primă etapă, între acidul oxalilacetic şi acetil-coenzima A are loc o reacţie de condensare la care participă grupa CH_3 a acetilului şi în care se formează acid citric. Acesta suferă o succesiune de degradări cunoscute sub numele de *ciclul acidului citric* (numit şi ciclul Krebs).

Acizii citric, α-cetoglutaric, fumaric şi malic sunt componentele normale ale tuturor celulelor vii. Oxidarea finală a hidraţilor de carbon, în toate celulele vii, decurge prin acest mecanism. Unii dintre intermediarii ciclului lui Krebs se transformă

în grăsimi şi în aminoacizi sau se formează din aminoacizi naturali, ca alanina, acidul asparagic şi acidul glutamic.

Succesiunea de reacţii începe cu acidul citric şi se termină cu acidul oxalilacetic, se eliberează $2CO_2$ şi 8H şi se consumă $2H_2O$. Reacţia globală a ciclului ar putea fi scrisă astfel:

$$CH_3COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 8H$$

Bioxidul de carbon format în această reacţie se regăseşte ca produs al respiraţiei (alături de cel provenit din acidul piruvic prin decarboxilare oxidativă).

$$C_6H_{12}O_2 + O_2 \longrightarrow 2CH_3COCOOH + 2H_2O$$

Cei opt atomi de hidrogen sunt fixaţi de codehidraza I şi cedaţi apoi de aceasta sistemului enzimatic al respiraţiei, compus din diaforază, citocrom şi citocrom-oxidază. Transferul a doi atomi de hidrogen către $1/2O_2$ prin intermediul acestui sistem enzimatic, care este de eliberarea a 52 kcal. Această energie este suficientă pentru a sinteti a patru legături de fosfat bogate în energie (de câte 11,5 kcal). În ciclul acidului citric, cuplat cu oxidarea hidrogenului degajat, se produc deci 16 legături bogate în energie.

Deoarece dintr-o moleculă de glucoză rezultă două de acid piruvic, din ciclul acidului citric rezultă 32 legături bogate în energie. În plus, din prima fază a procesului oxidativ mai rezultă alte opt legături bogate în energie. Întregul proces de oxidare a unei molecule de glucoză (sub formă de glicogen) dă naştere la 40 legături bogate în energie, cu un conţinut de 460 kcal, utilizabile pentru sinteze. În procesul oxidativ se produce deci incomparabil mai multă energie decât în procesul anaerob.

Prin arderea completă a glucozei în bomba calorimetrică se degajă (—ΔH) 674 kcal/mol. Variația entropiei (TΔS din ecuația: ΔG = ΔH—TΔS) este de circa 12 kcal, așa încât descreșterea totală a entalpiei libere (—ΔG) este de 686 kcal. Dintre acestea se pot recupera, în oxidarea biochimică a glucozei, circa 67%, într-o formă utilizabilă pentru a produce un lucru mecanic sau sinteze chimice endoergice. Acest randament energetic întrece mult pe cel al celor mai bune motoare termice construite până acum. Funcția ciclului acidului citric este deci producția de energie, acesta furnizând de fapt combustibilul necesar, pe lângă obținerea de intermediari pentru sintezele de aminoacizi și de acizi grași.

Fotosinteza hidraților de carbon în plante

Asimilația bioxidului de carbon realizată de către plantele verzi, sub influența luminii, este singura reacție din natură în care iau naștere substanțe organice din cele anorganice. Produsul principal al fotosintezei este amidonul, o polizaharidă compusă din resturi de D-glucoză, dar s-a observat în frunzele verzi de asemenea formarea de grăsimi și de proteine, care provin din intermediari comuni.

Fotosinteza decurge prin intermediul pigmenților din frunzele verzi. Aceștia sunt clorofila a (albastră-verde), clorofila b (galbenă-verde) și carotinoidele (carotine portocalii și xantofile galbene). Sistemul acesta de pigmenți este conținut în cloroplaste, niște corpuscule de formă alungită din celulele frunzelor verzi. Energia luminoasă absorbită de un pigment poate fi transmisă altui pigment din cloroplastă. Când se ilumineză cloroplastele cu o lungime de undă ce este absorbită numai de clorofila b, lumina emisă

prin fluorescență conține și lungimi de undă caracteristice ale clorofilei a, iar fluorescența clorofilei b este micșorată. Ceilalți pigmenți din celulă pot transmite, în mod similar, energia absorbită clorofilei a. Prin acest mecanism se lărgește regiunea spectrală utilizabilă în fotosinteză. Clorofila a transmite apoi energia radiantă absorbită, sistemului chimic.

Celulele plantelor fotosintetizante conțin unul sau mai multe tipuri de coloranți verzi numiți clorofile. Algele și bacteriile fotosintetizante conțin însă coloranți purpurii, roșii sau bruni. În celulele fotosintetizantelor se mai pot găsi și alte clase de coloranți capabili să absoarbă lumina. Dintre acești pigmenți auxiliari pot fi amintite carotinoidele galbene și ficobilinele roșii sau albastre.

In vitro s-a realizat sinteza unei hexoze, din acid fosfogliceric cu sistemul cloroplaste-codehidrază II (Ochoa, 1952). Pentru realizarea acestei sinteze nu a fost suficientă prezența hidrogenului la un potențial chimic ridicat (sub formă de NADPH, format fotochimic), ci și energia din două legături bogate în energie ale acidului adenozin-trifosforic:

$$2\ H_2O + \text{Acid fosfogliceric} + 2\ \text{ATP} \xrightarrow{\text{lumina}}$$

$$\rightarrow \text{1,6-Difosfat de fructoza} + 2\ \text{ADP} + 2\ H_3PO_4 + O_2$$

Acidul adenozin-trifosforic se regenerează în cursul fotosintezei, printr-o reacție de oxidare, ce decurge paralel cu reducerile. Prin aceasta se pierde aproximativ 2/3 din hidrogenul legat ca hidrocodehidrază (NADH) în cursul reacției fotochimice, însă se formează, printr-o reacție la întuneric, două legături de fosfat bogate în energie, ce servesc în sinteze ulterioare. Reacția de formare a acidului adenozin-trifosforic are loc numai în prezența unor enzime

conținute în mitocondriile celulelor din frunzele verzi. Prin incubarea de cloroplaste, mitocondrii, NAD, fosfat anorganic și ADP s-a realizat sinteza fotochimică de ATP.

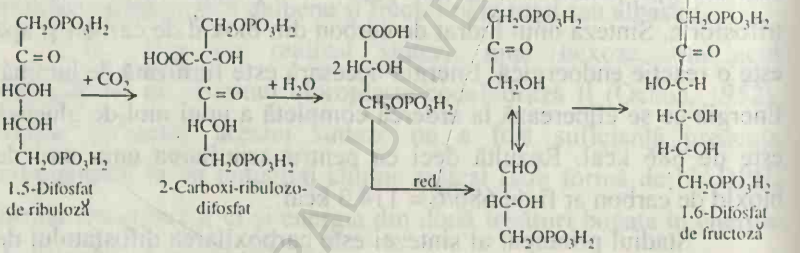
$$H_2O + NAD \xrightarrow[\text{cloroplaste}]{\text{lumina}} NADH + 1/2O_2$$

$$NADH + 1/2O_2 + 3\,H_3PO_4 + 3\,ADP \xrightarrow{\text{mitocondrii}} NAD + H_2O + 3\,ATP$$

Un terci de frunze de spanac poate cataliza, la întuneric, transformarea bioxidului de carbon în hidrați de carbon, dacă sunt prezenți fosfatul de riboză, acidul adenozin-trifosforic și hidrocodehidraza. Lumina are rolul de a produce hidrocodehidrază, care servește pentru hidrogenări și pentru a produce acid adenozin-trifosforic. Sinteza unui hidrat de carbon din bioxid de carbon și apă este o reacție endoergică. Energia necesară este furnizată de lumină. Energia ce se eliberează la arderea completă a unui mol de glucoză este de 686 kcal. Rezultă deci că pentru asimilarea unui mol de bioxid de carbon ar fi de 686/6 = 114,3 kcal.

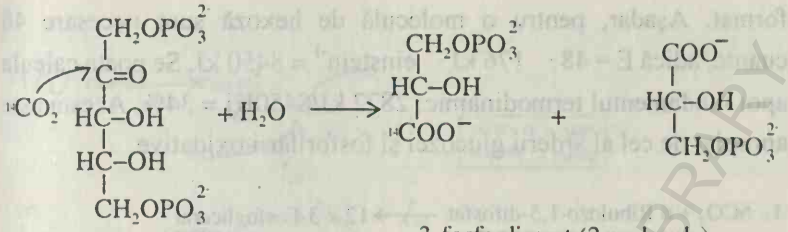
Stadiul principal al sintezei este carboxilarea difosfatului de ribuloză, reacție catalizată de carboxidismutază, care conduce la un acid β-cetonic ramificat, 2-carboxi-3-cetopentoză-difosfat. Acesta se rupe hidrolitic în două molecule de acid fosfo-D-gliceric, un intermediar al fermentației și glicolizei. Acest compus suferă în continuare transformări în sens invers celor urmate în fermentație și glicoliză, ajungând la 1,6-difosfatul de fructoză. Procesele menționate sunt endoergice (în special reducerea grupei carboxil la aldehidă) și au nevoie de hidrogen provenit din descompunerea fotochimică a apei, de codehidrază II și acid adenozin-trifosforic.

1,6-Difosfatul de fructoză este folosit pentru sinteza hidraților de carbon, a proteinelor și a grăsimilor. Totodată acesta dă naștere unor mono- și difosfați de monozaharide, care se transformă reciproc prin achilibre enzimatice rapide, constituind împreună *ciclul staționar al fotosintezei.* Importanți sunt difosfatul de ribuloză și cel de sedoheptuloză. Acești difosfați de aldoze și cetoze se condensează și se decondensează aldolic prin echilibre de tipul $C_7 + C_3 = 2C_5$ sau $C_3 + C_6 = C_4 + C_5$ (cf. Schemei). Forța motoare a ciclului staționar este potențialul chimic ridicat al hidrogenului produs fotochimic. O parte din enzime și coenzime (codehidraze, acid adenozin-trifosforic, aldolaza etc.) sunt aceleași ca în glicoliză.



Mecanismul sintezei glucozei la algele verzi a fost stabilit de M. Calvin și colab. Prin utilizarea $^{14}CO_2$. Iluminarea scurtă, de câteva secunde, a algelor a fost urmată de uciderea plantelor, extragerea produșilor rezultați și separarea lor cromatografică.

Primul compus marcat care apare în procesul fotosintezei este acidul 3-fosfogliceric (fig. 4.5). Izotopul se găsește în atomul de carbon al carboxilului. Reacția este catalizată de ribulozo-difosfat-carboxilază.



Ribulozo-1,5-difosfat

3-fosfoglicerat (2 molecule)

Fig. 4.5. Prima reactie chimica la intuneric din ciclul fotosintezei

Enzima are M = 550.000 şi se găseşte în cantitate mare în celule, reprezentând aproximativ 15 % din proteina totală a cloroplastelor. Calvin a presupus că formarea hexozelor în fotosinteză se realizează printr-un mecanism ciclic (fig.4.6 şi fig. 4.7).

Bilanţul energetic al fotosintezei

Variaţia energiei libere standard la sinteza unei hexoze din CO_2 şi H_2O este:

$$6CO_2 + 6H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad \Delta G^o = +2872 \text{ kJ}$$

Energia unei cuante luminoase depinde de lungimea de undă. Ea este de 293 kJ / einstein la 400 nm şi 176 kJ / einstein la 700 nm. Din cauza participării lui P_{700} la fotosinteză, care absoarbe la 700 nm, se consideră pentru bilanţul energetic, valoarea de 176 kJ / einstein.

Numărul de cuante de lumină folosite experimental este proporţional cu cantitatea de CO_2 redus. Trebuie aflat numărul de cuante necesare unei molecule de hexoză. S-au calculat 48 cuante pe molecula de hexoză, sau 8 cuante pentru fiecare moleculă de O_2

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

format. Aşadar, pentru o moleculă de hexoză sunt necesare 48 cuante, adică E = 48 · 176 kJ · einstein^{-1} = 8450 kJ. Se poate calcula apoi randamentul termodinamic: 2872 kJ/8450Kj = 34%. Acesta este apropiat de cel al arderii glucozei şi fosforilării oxidative.

1. $6CO_2$ + 6 Ribulozo-1,5-difosfat ⟶ 12 x 3-Fosfoglicerat
2. 12 x 3-fosfoglicerat + 12ATP ⟶ 12 x 1,3-difosfoglicerat
3. 12 x 1,3-difosfoglicerat + 12NADPH + 12H$^+$ ⟶ 12Glicerinaldehid-3-fosfat + 12NADP$^+$
4. 5Glicerinaldehid-3-fosfat ⟶ 5Dihidroxiacetonfosfat
5. 3Glicerinaldehid-3-fosfat + 3Dihidroxiacetonfosfat ⟶ 3Fructozo-1,6-difosfat
6. 3Fructozo-1,6-difosfat ⟶ 3Fructozo-6-fosfat + 3Pa
7. Fructozo-6-fosfat ⟶ Glucozo-6-fosfat
8. Glucozo-6-fosfat ⟶ Glucoza + Pa
9. 2Fructozo-6-fosfat + 2Glicerinaldehid-3-fosfat $\xrightarrow{transcetolaza}$ Xilulozo-5-fosfat + 2Eritrozo-4-fosfat
10. 2Eritrozo-4-fosfat + 2Dihidroxiacetonfosfat $\xrightarrow{aldolaza}$ 2 Sedoheptulozo-1,7-difosfat
11. 2Sedoheptulozo-1,7-difosfat $\xrightarrow{fosfataza}$ 2Sedoheptulozo-7-fosfat + 2Pa
12. 2 Sedoheptulozo-7-fosfat + 2Glicerinaldehid-3-fosfat $\xrightarrow{transcetolaza}$ 2Ribozo-5-fosfat + 2Xilulozo-5-fosfat
13. 2Ribozo-5-fosfat $\xrightarrow{izomeraza}$ 2Ribulozo-5-fosfat
14. 4Xilulozo-5-fosfat $\xrightarrow{epimeraza}$ 4Ribulozo-5-fosfat
15. 6Ribulozo-5-fosfat + 6ATP $\xrightarrow{fosforibulokinaza}$ 6Ribulozo-1,5-difosfat + 6ADP

Fig. 4.6. Reacţiile fotosintezei

Dacă se consideră cea de-a doua fază, a reducerii CO_2 la întuneric, se poate scrie ecuaţia:

$$6CO_2 + 12NADPH + 12H^+ + 18ATP + 12\,H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 12NADP^+ + 18ADP + 18P_a$$

Sunt aşadar necesare 18 molecule de ATP şi 12 de NADPH pentru a reduce 6 molecule de CO_2.

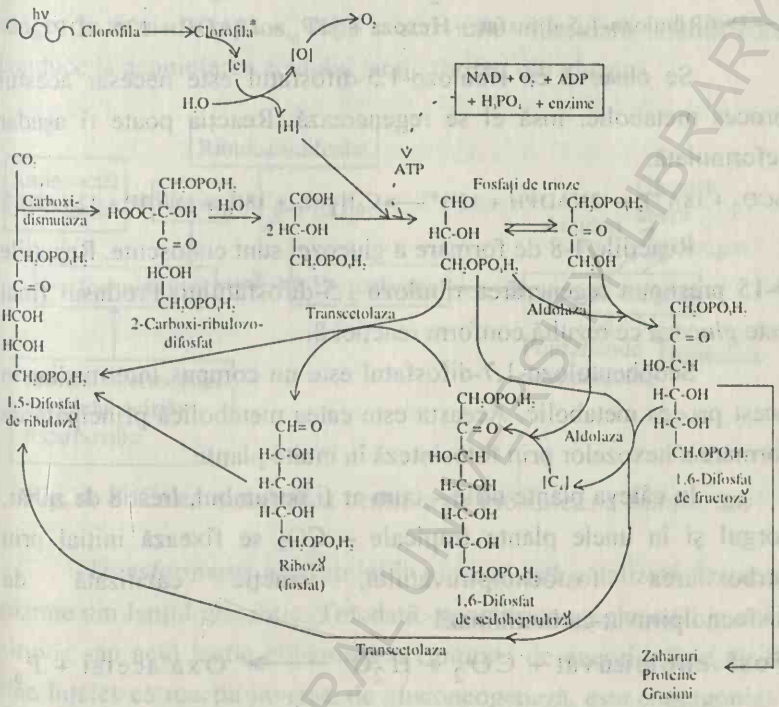


Fig. 4.7. Schema generala a fotosintezei

În timpul transportului de electroni, se formează însă 24 molecule de ATP şi 12 de NADPH:

$$48h\nu + 12H_2O + 12NADP^+ + 24\,P_a + 24ADP \longrightarrow 6O_2 + 12NADPH + 12H^+ + 24ATP + 12H_2O$$

Se formează o cantitate mai mare de ATP decât este necesar reducerii CO_2 în faza de întuneric.

Întregul şir de reacţii poate fi prezentat global prin ecuaţia generală:

BCU "AS" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$6\text{Ribulozo-1,5-difosfat} + 6CO_2 + 18\text{ATP} + 12\text{NADPH} + 12H^+ \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 6\text{Ribulozo-1,5-difosfat} + \text{Hexoza} + 18P_a + 18\text{ADP} + 12\text{NADP}^+$$

Se observă că ribulozo-1,5-difosfatul este necesar acestui proces metabolic, însă el se regenerează. Reacția poate fi așadar reformulată:

$$6CO_2 + 18\text{ATP} + 12\text{NADPH} + 12H^+ \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 18P_a + 18\text{ADP} + 12\text{NADP}^+$$

Reacțiile 1-8 de formare a glucozei sunt cunoscute. Reacțiile 9-15 presupun regenerarea ribulozo-1,5-difosfatului. Produsul final este *glucoza* ce rezultă conform reacției 8.

Sedoheptulozo-1,7-difosfatul este un compus intermediar în acest proces metabolic. Aceasta este calea metabolică principală de formare a hexozelor prin fotosinteză în multe plante.

În câteva plante utile – cum ar fi porumbul, trestia de zahăr, sorgul și în unele plante tropicale – CO_2 se fixează inițial prin carboxilarea fosfoenolpiruvatului, reacție catalizată de fosfoenolpiruvat-carboxikinază:

$$\text{Fosfoenolpiruvat} + CO_2 + H_2O \longrightarrow \text{Oxalacetat} + P_a$$

Oxaloacetatul astfel format este transformat în glucoză prin intermediul 3-fosfogliceratului.

Biosinteza zaharurilor

Acest proces reprezintă calea metabolică principală de biosinteză a monozaharidelor și polizaharidelor atât în plante cât și în animale (fig. 4.8). Formarea hidraților de carbon din aminoacizi, acid lactic etc. se numește gluconeogeneză. Un exemplu în acest sens îl

constituie sinteza glucozei în ficat din acidul lactic adus de către sânge, în faza de repaos, după o activitate musculară intensă care conduce la acumularea acidului lactic format din glucoză.

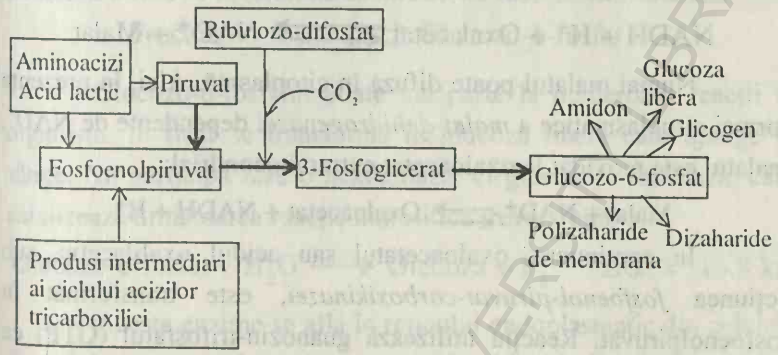


Fig. 4. 8. Calea metabolica centrala de biosinteza a zaharurilor

Transformarea piruvatului în glucoză este catalizată de unele enzime din lanţul glicolitic. Totodată, transformarea glucozei în acid piruvic sau acid lactic eliberează o cantitate de energie. Este de la sine înţeles că reacţia inversă, de gluconeogeneză, este endergonică. De unde este luată energia necesară acestui proces ? Evident din respiraţie, proces care se desfăşoară la nivelul mitocondriilor. Din această cauză reacţia se desfăşoară pe o cale alternativă (fig. 4.9).

1. Prima limitare se întâlneşte la transformarea piruvatului în fosfoenolpiruvat, unde $\Delta G^\circ > 0$, deci reacţia nu este posibilă:

$$\text{Piruvat} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Fosfoenolpiruvat} + \text{ADP};\ \Delta G^\circ = +31{,}4\ \text{kJ}$$

În locul acestei reacţii, are loc o altă reacţie catalizată de piruvat carboxilază la nivelul mitocondriilor:

$$\text{Piruvat} + CO_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{AcetilCoA}} \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + P_a$$

Piruvat-carboxilaza este o enzimă alosterică care devine complet inactivă în absența activatorului său, acetil CoA.

Aceasta transformă piruvatul în oxalacetat în mitocondrie care este redus printr-o reacție dependentă de NADH, la malat:

$$NADH + H^+ + \text{Oxalacetat} \rightleftharpoons NAD^+ + \text{Malat}$$

Numai malatul poate difuza în citoplasmă. Aici, în prezența formei citoplasmatice a *malat-dehidrogenazei* dependente de NAD^+, malatul este reoxidat la oxaloacetat extramitocondrial:

$$\text{Malat} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Oxaloacetat} + NADH + H^+$$

În continuare, oxaloacetatul sau acidul oxalilacetic, sub acțiunea *fosfoenol-piruvat-carboxikinazei*, este transformat în fosfoenolpiruvat. Reacția utilizează guanozin-trifosfatul (GTP) ca sursă de fosfat:

$$\text{Oxaloacetat} + GTP \xrightarrow{Mg} \text{Fosfoenolpiruvat} + CO_2 + GDP$$

În acest caz se poate rescrie transformarea piruvatului în fosfoenolpiruvat:

$$\text{Piruvat} + ATP + GTP \rightleftharpoons \text{Fosfoenolpiruvat} + ADP + GDP + P_a$$

Se consumă astfel, în reacția globală, două molecule bogate în energie, una de ATP și alta de GTP, care însumează –30,5 kJ, energie suficientă transformării piruvatului în fosfoenolpiruvat.

2. Cea de-a doua reacție din secvența glicolitică, în direcția gluconeogenezei ce trebuie ocolită este fosforilarea fructozo-6-fosfatului sub acțiunea *fosfofructokinazei*. La sinteza glucozei, această reacție ireversibilă este înlocuită cu difosfofructozo-fosfataza, cunoscută și ca fructozo-bifosfatază. Ea catalizează

hidroliza completă a grupei 1-fosfat cu formarea de fructozo-6-fosfatului:

$$\text{Fructozo-1,6-difosfat} + H_2O \longrightarrow \text{Fructozo-6-fosfat} + P_a \quad \Delta G^o = -16{,}3 \text{ kJ}$$

Urmează o reacție reversibilă catalizată de fosfohexoizomerază:

$$\text{Fructozo-6-fosfat} \rightleftarrows \text{Glucozo-6-fosfat}$$

Glucozo-6-fosfatul poate lua parte la numeroase reacții în organism. În ficat se transformă în glucoză liberă care ajunge în sânge. Nu participă însă o hexokinază, ci glucozo-6-fosfataza, care catalizează următoarea reacție hidrolitică ireversibilă:

$$\text{Glucozo-6-fosfat} + H_2O \longrightarrow \text{Glucoza} + P_a \quad \Delta G^o = -13{,}8 \text{ kJ}$$

Aceste enzime se află în reticulul endoplasmatic din celulele ficatului vertebratelor și servesc în biochimie drept enzime conducătoare pentru astfel de structuri. Glucozo-6-fosfataza nu se găsește în mușchi și creier, de aceea aceste organe nu pot elibera în sânge glucoză liberă.

Reacția globală de formare a glucozei din piruvat este următoarea:

$$2CH_3COCOOH + 4ATP + 2GTP + 2NADH + 2H^+ + 6H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Glucoza} + 2NAD^+ + 4ADP + 2GDP + 6P_a$$

Pentru fiecare moleculă de glucoză se utilizează 6 legături fosfat bogate în energie și 2 molecule de NADH ca reducători. Este limpede că această serie de reacții nu reprezintă pur și simplu opusul reacției de formare a piruvatului din glucoză:

$$\text{Glucoza} + 2ADP + 2P_a + 2NAD^+ \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 2CH_3COCOOH + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O$$

Reglarea formării din piruvat a glucozo-6-fosfatului

Prima treaptă este catalizată de piruvat-carboxilază, o enzimă alosterică, ce este catalizată de acetil CoA. Reacția va fi deci favorizată de un exces mitocondrial de acetil CoA.

Al doilea punct de control al acestei căi metabolice îl constituie reacția catalizată de difosfofructozo-fosfatază, ce este împiedicată de AMP și stimulată de ATP. Se face deci un control prin combustibilul acetil CoA și de asemenea prin ATP.

Gluconeogeneză din intermediarii ciclului Krebs

Piruvatul sau fosfoenolpiruvatul pot fi obținuți din citrat, izocitrat, cis-aconitat, α-cetoglutarat, succinat și fumarat, care în ciclul acizilor tricarboxilici pot fi transformați în malat. Acesta poate apoi părăsi mitocondria și se poate oxida în citoplasmă la oxalat. Aici are loc transformarea în fosfoenolpiruvat prin acțiunea fosfoenolpiruvat-carboxikinazei.

Gluconeogeneza din aminoacizi

Aminoacizii pot fi transformați în acetil CoA sau în intermediari ai ciclului Krebs și mai departe în glucoză. Ei se numesc glucoplastici și sunt de tipul alaninei, acidului glutamic și a acidului asparagic. Ei sunt dezaminați la piruvat, α-cetoglutarat și oxalacetat care, în ciclul acizilor tricarboxilici, sunt transformați în malat și, în sfârșit în fosfoenolpiruvat.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

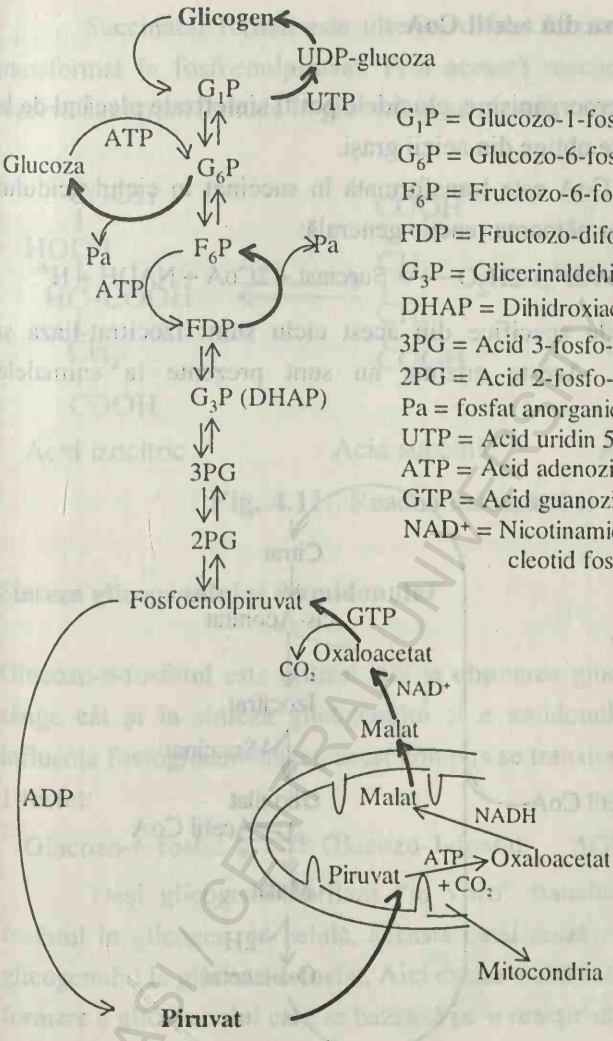


Fig. 4.9. Reactia ocolitoare in sinteza glucozei si glicogenului din piruvat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Gluconeogeneza din acetil CoA

În plante şi microorganisme, glucidele pot fi sintetizate plecând de la acetil CoA ce se obţine din acizii graşi.

Acetil CoA este transformată în succinat în ciclul acidului glioxilic, prin următoarea reacţie generală:

$$2\text{Acetil CoA} + NAD^+ + 2H_2O \longrightarrow \text{Succinat} + 2\text{CoA} + NADH + H^+$$

Enzimele specifice din acest ciclu sunt: izocitrat-liaza şi malat-sintetaza. Aceste enzime nu sunt prezente la animalele superioare.

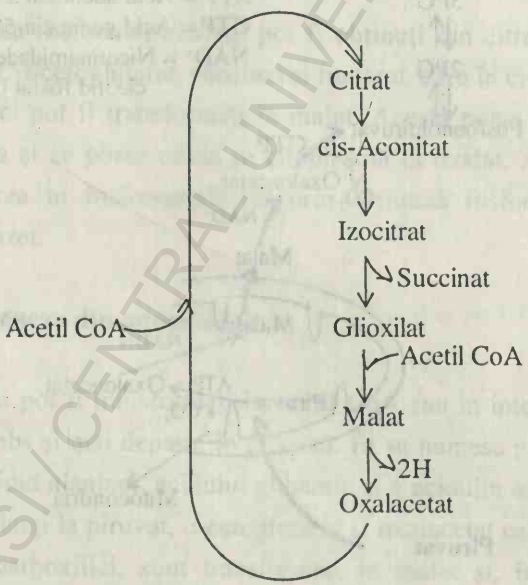


Fig. 4.10. Ciclul acidului glioxilic

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Succinatul format este ulterior oxidat la oxalacetat şi apoi transformat în fosfoenolpiruvat. Prin această reacţie, grăsimile de rezervă sunt transformate în glucoză în seminţele care încolţesc.

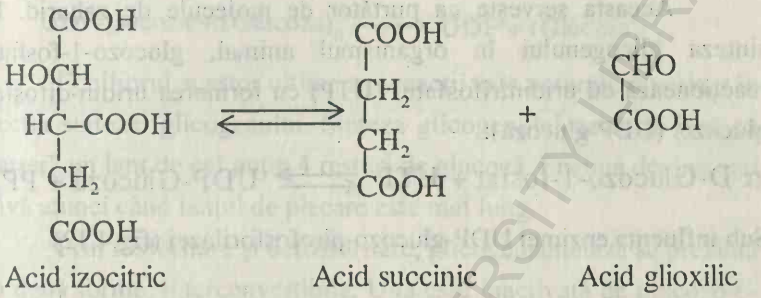


Fig. 4.11. Reactia izocitratazei

Sinteza glicogenului şi a amidonului

Glucozo-6-fosfatul este utilizat atât la obţinerea glucozei libere din sânge cât şi la sinteza glicogenului şi a amidonului. Astfel, sub influenţa fosfoglucomutazei, acest compus se transformă în glucozo-1-fosfat:

Glucozo-6-fosfat $\rightleftharpoons$ Glucozo-1-fosfat $\quad \Delta G^o = +7{,}27$ kJ

Deşi glicogenfosforilaza "in vitro" transformă glucozo-1-fosfatul în glicogen, în celulă, aceasta catalizează numai scindarea glicogenului la glucozo-1-fosfat. Aici există o altă cale metabolică de formare a glicogenului care se bazează pe o reacţie utilizată şi pentru biosinteza dizaharidelor, oligozaharidelor şi polizaharidelor. L. Leloir şi colaboratorii săi au arătat că donorul de unităţi de monozaharidă este un nucleozid-difosfatglucid. Sub influenţa unei

pirofosforilaze, nucleozid-5'-trifosfatul (NTP) şi zahăr-1-fosfatul dau derivatul glucidic corespunzător:

$$NTP + Zahar\text{-}1\text{-}fosfat \rightleftharpoons NDP\text{-}Zahar + PP_a$$

Aceasta serveşte ca purtător de molecule de zaharid. La sinteza glicogenului în organismul animal, glucozo-1-fosfatul reacţionează cu uridintrifosfatul (UTP) cu formarea uridin-difosfat-glucozei (UDP-glucoză):

$$\alpha\text{-D-Glucozo-1-fosfat} + UTP \rightleftharpoons UDP\text{-Glucoza} + PP_a$$

Sub influenţa enzimei UDP-glucozo-pirofosforilazei (fig.4.12)

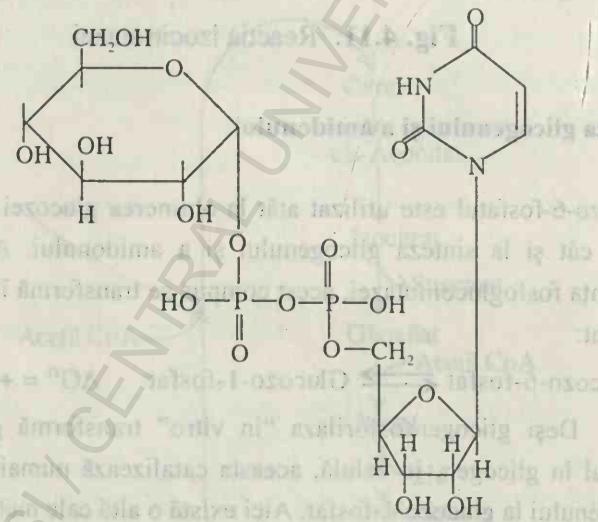


Fig. 4.12. Uridin-difosfatglucoza

În a doua etapă, UDP-glucoza este transportată la capătul reducător al unui rest de glucoză din lanţul amilazei.

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se formează astfel o legătură α(1→4) glicozidică între atomul C_1 al restului glicozil transportat şi grupa hidroxil din poziţia 4 a restului terminal al lanţului amilazic. Reacţia este catalizată de glicogensintetază:

$$\text{UDP-glucoza} + (\text{Glucoza})_n \longrightarrow \text{UDP} + (\text{Glucoza})_{n+1}$$

Echilibrul acestor ultime trei reacţii este puternic favorizat în direcţia sintezei glicogenului. Sinteza glicogenului necesită însă ca "starter" un lanţ de cel puţin 4 resturi de glucoză. Enzima devine mai activă atunci când lanţul de plecare este mai lung.

Prin fosforilare şi defosforilare, glicogensintetaza se prezintă sub două forme, interconvertibile. Una este inactivată de glucozo-6-fosfat (forma D; D = dependent). Cealaltă, forma I (I = independent) nu depinde de concentraţia glucozo-6-fosfatului. Când creşte concentraţia glucozo-6-fosfatului în celulă, acesta acţionează ca un modulator alosteric, pozitiv ce stimulează de peste 40 ori activitatea glicogen-sintetazei. Pe această cale se formează glicogen din surplusul de glucozo-6-fosfat. Formarea şi descompunerea glicogenului este reglată şi coordonată hormonal.

Glicogen-sintetaza nu poate realiza legături α(1→6) în punctele nodale ale glicogenului. În celulele animalelor se află enzima amilo(1,4→1,6)transglicolaza ("glycogen-branching enzyme") capabilă să catalizeze transferul unui fragment terminal de oligozaharid cu 6-7 resturi de glucoză de la un capăt al lanţului principal la grupa 6-hidroxil al altui rest de glucoză al aceluiaşi lanţ de glicogen sau al altuia.

În plante, sub acţiunea amilaz-sintetazei are loc sinteza amidonului printr-un proces metabolic similar. Totuşi, în cele mai

multe plante, donorul de glucoză este ADP-glucoza (ADPG) în locul UDP-glucozei (UDPG).

Transformarea glucozo-6-fosfatului în alte hexoze

D-Glucoza poate fi epimerizată enzimatic de D-galactoză, la nivelul atomului de carbon C_4:

$$\text{UDP-Glucoza} \rightleftharpoons \text{UDP-Galactoza}$$

UDP-Galactoza este folosită în continuare la sinteza Lactozei din lapte.

$$\text{UDP-Galactoza} + \text{D-Glucoza} \longrightarrow \text{UDP-Lactoza}$$

În multe plante se întânlesc mari cantităţi de zaharoză. Aceasta este sintetizată prin următorul şir de reacţii:

$$\text{ATP} + \text{Glucoza} \longrightarrow \text{Glucozo-6-fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucozo-6-fosfat} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{Glucozo-1-fosfat}$$

$$\text{UTP} + \text{Glucozo-1-fosfat} \longrightarrow \text{UDP-Glucoza} + \text{PPa}$$

$$\text{ATP} + \text{Fructoza} \longrightarrow \text{Fructozo-6-fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{UDP-Glucoza} + \text{Fructozo-6-fosfatul} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \text{UDP} + \text{Zaharoza-6'-fosfat}$$

$$\text{Zaharoza-6'-fosfat} + H_2O \longrightarrow \text{Zaharoza} + \text{Pa}$$

$$2\text{ATP} + \text{UTP} + \text{Glucoza} + \text{Fructoza} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \text{Zaharoza} + 2\text{ADP} + \text{UDP} + \text{PPa} + \text{Pa}$$

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" LIBRARY

CAP. V. METABOLISMUL ACIZILOR GRAŞI ŞI AL PROSTAGLANDINELOR

Biosinteza acizilor graşi

Biosinteza acizilor se realizează cel puţin pe două căi diferite, în citoplasma celulară (*sistemul citoplasmatic sau amitocondrial*) şi la nivelul mitocondriilor (*sistemul mitocondrial al sintezei acizilor graşi*). Rapier, în 1907, a arătat că, deoarece acizii graşi sunt compuşi din 4 – 20 atomi de carbon, aceştia ar trebui să fie biosintetizaţi plecând de la compuşi foarte reactivi cu câte doi atomi de carbon. După introducerea izotopilor radioactivi în anii 1930 – 1940, s-a putut demonstra participarea la sinteza acizilor graşi a unor derivaţi de acid acetic. Astfel, David Rittenberg şi Konrad Bloch, în 1944 şi 1945, hrănind şoarecii cu acid acetic marcat cu deuteriu şi ^{13}C ($C^2H_3{}^{13}COOH$) au găsit că ambii izotopi au fost încorporaţi în moleculele de acid gras sintetizate. După ce Lynen a descoperit că "acetatul activ" nu este altul decât acetil-CoA, s-a stabilit rolul principal jucat în biosinteza acizilor graşi de către aceasta.

Sistemul citoplasmatic al sintezei acizilor graşi. Toate celulele vii sintetizează acizii graşi prin acelaşi lanţ de reacţii chimice. Există însă o diferenţă substanţială între enzimele care catalizează aceste reacţii. Aşadar, a fost identificat în ţesuturile organismelor mamiferelor (ficat, rinichi, etc.), precum şi la levuri un sistem citoplasmatic al sintezei acizilor graşi care are ca produs final un acid gras saturat — *acidul palmitic.*

Trăsătura esenţială a sistemului citoplasmatic al biosintezei acizilor graşi este dependenţa sa totală de CO_2 (sau bicarbonat),

precum şi necesitatea în ATP, ioni de Mg^{2+} sau Mn^{2+}, NADPH + H^+, biotină sau prezenţa acidului citric.

În prima fază, acetil~CoA, unitatea de bază a acizilor graşi pentru sinteza acestora în citoplasmă, este carboxilată, cu formare de malonil-CoA:

$$Ac\sim CoA + CO_2 \xrightarrow[+\ ATP;\ +\ Mg^{2+}]{\text{Acetil-CoA-carboxilaza}} \text{Malonil}\sim CoA$$

Reacţia este catalizată de acetil-CoA-carboxilaza, în prezenţa ATP, Mg^{2+}, CO_2 şi a biotinei, în calitate de grupare prostetică a enzimei.

Biotina limitează viteza cu care sunt sintetizaţi acizii graşi în citoplasma eucariotelor şi procariotelor. Reamintim că eucariotele sunt plante sau animale evoluate care au în celulă un nucleu tipic, separat prin membrană. Procariotele sunt organisme primitive (viruşi, bacterii, alge albastre), unicelulare, cu structură simplă.

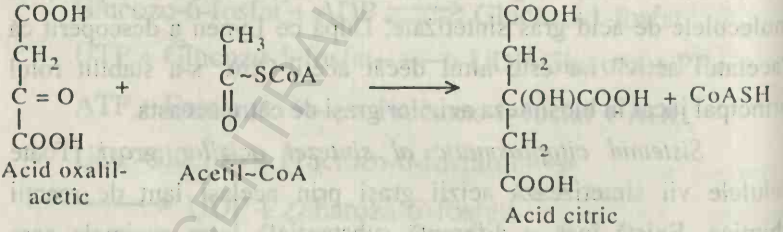


Fig. 5.1. Formarea acidului citric din acetil~CoA, necesar transportului acesteia in citoplasma, in vederea sintezei acidului palmitic

Sursa de acetil~CoA: decarboxilarea oxidativă a piruvatului şi β-oxidarea acizilor graşi superiori (în mitocondrie).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deoarece membrana mitocondrială este impermeabilă pentru acetil~CoA, aceasta este transportată sub forma acidului citric (fig. 5.1).

Acidul citric trece din mitocondrie în citoplasmă unde este scindat, în prezența unei enzime ATP-dependente (Fig. 5.2).

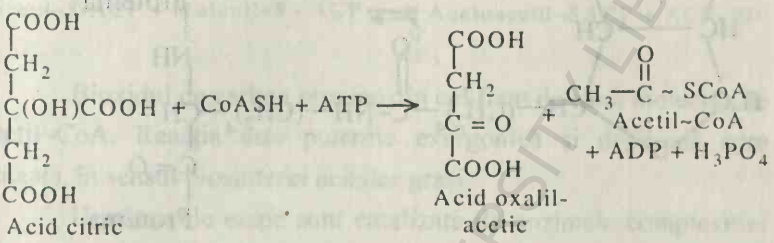
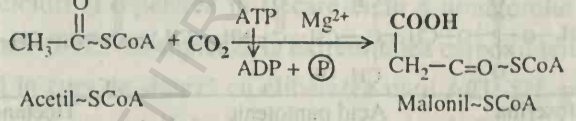


Fig. 5.2. Refacerea acetilcoenzimei A în citoplasma din acid citric

Așa se explică acțiunea stimulatoare a acidului citric asupra biogenezei acizilor grași superiori.

Formarea malonil~CoA are loc în citoplasmă din acetil ~ SCoA și CO_2 în prezența biocitinei (fig. 5.3):



Reacția globală poate fi scrisă astfel:

$$CO_2 + \text{Biotinenzima} + ATP \xrightleftharpoons{Mn^{2+}} \text{Carboxibiotinenzima} + ADP + H_3PO_4$$

$$\text{Carboxibiotinenzima} + \text{Acetil~SCoA} \xrightleftharpoons{Mn^{2+}} \text{Malonil~SCoA} + \text{Biotinenzima}$$

În etapa următoare intervine o proteină solubilă, cu $M=10^4$ daltoni și care are ca grupare prostetică 4'-fosfopantoteina, legată

covalent de un rest de fosfoserină. Se numeşte proteină purtătoare de acil ("acyl carrier protein" = ACP).

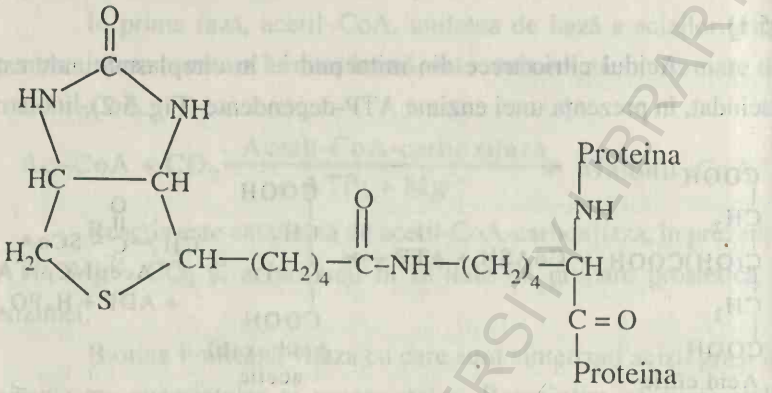
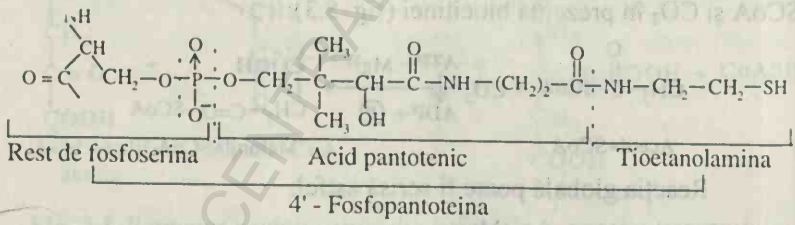


Fig. 5.3. Structura biotinei in proteina purtatoare de grupe carboxil (biotin carboxyl carrier protein - BCCP)

Gruparea funcţională a ACP este grupa SH liberă care poate forma esteri cu diferiţi radicali acil (acetil sau malonil).



Două enzime diferite, malonil~CoA:ACP-transacilaza şi acetil~CoA:ACP-transacilaza, care sunt sulfhidrilenzime, catalizează formarea de tioesteri ai ACP şi eliberarea de CoASH:

$$\text{Acetil~SCoA} + \text{ACP~SH} \rightleftharpoons \text{Acetil~S-ACP} + \text{CoASH}$$
$$\text{Malonil~SCoA} + \text{ACP~SH} \rightleftharpoons \text{Malonil~S - ACP~SH} + \text{CoASH}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

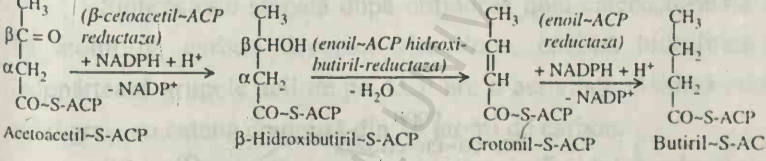
Cele două enzime fac parte din *complexul multienzimatic al sintetazei acizilor graşi*, din care ACP nu poate fi izolată.

O enzimă de condensare catalizează condensarea acetil~S-ACP şi malonil~SACP cu formare de acetoacetil~SACP şi ACP~SH:

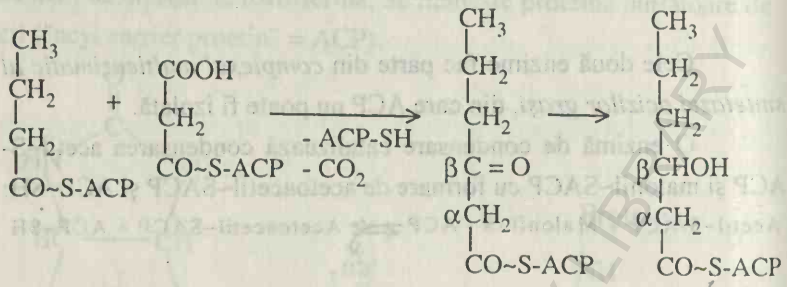
$$\text{Acetil~S-ACP} + \text{Malonil~S - ACP} \rightleftharpoons \underset{\downarrow CO_2}{\text{Acetoacetil~SACP}} + \text{ACP~SH}$$

Bioxidul de carbon provine din cel fixat de către molecula de acetil~CoA. Reacţia este puternic exergonică şi deplasată spre dreapta, în sensul biosintezei acizilor graşi.

Următoarele etape sunt catalizate de enzimele complexului sintetazei acizilor graşi:



Pentru sinteza unui mol de acid palmitic sunt necesare 7 asemenea cicluri şi repetarea în fiecare ciclu a următorului proces: metil-malonil~SACP se cuplează la extremitatea carboxil terminală a catenei acil în curs de sinteză cu eliberarea unui ACP-SH, pierderea grupei carboxil a malonilului şi eliminarea ei sub formă de CO_2 şi condensarea acil~SACP cu malonil~SACP cu formarea unui cetoacil~SACP cu doi atomi de carbon mai mult decât precedentul (fig. 5.4). Acidul rezultat este transformat de complexul multienzimatic al sintetazei acizilor graşi după acelaşi mecanism: butiril~SACP rezultat cu malonil~SACP se condensează după reacţia:



Rezultat final: *acidul palmitic*.

Sursa fragmentelor de carbon: malonil~SCoA care provine din acetil~SCoA. Bilanț: 1 mol acetil~CoA; 14 moli NADPH + H^+; 7 moli malonil~SCoA conduc la 14 moli $NADP^+$; 7 moli CO_2; 7 CoA~SH și 6 H_2O.

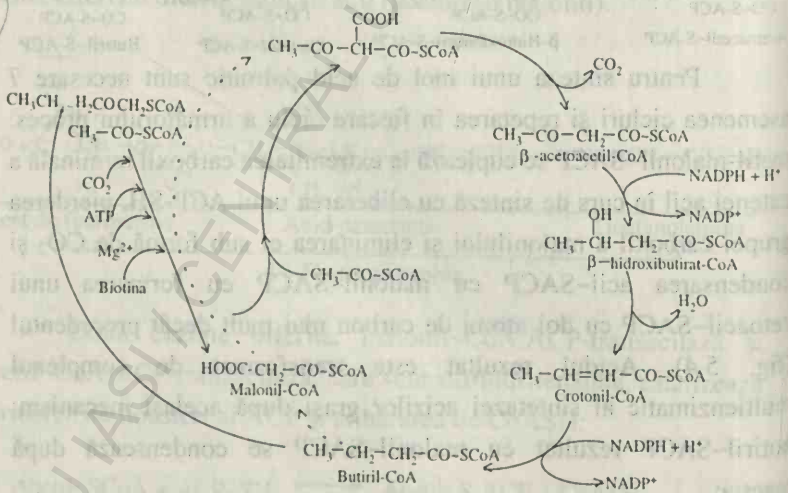


Fig. 5.4. Schema biosintezei acizilor grasi

NADPH se formează prin oxidarea glucozo-6-fosfatului la ribulozo-5-fosfat, prin oxidarea acidului malic la acid piruvic, iar în plantele verzi prin fotoreducerea $NADP^+$ la $NADPH + H^+$.

Reacția de formare citoplasmatică a acidului palmitic s-ar mai putea scrie astfel:

$$8\ CH_3 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - CoA + ACP + 7\ HCO_3^- + 7\ ATP + 14\ NADPH + 21\ H^+ \downarrow$$

$$CH_3 - (CH_2)_{14} - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - ACP + 8\ CoA + 14\ NADP^+ + 7\ ADP + 7\ H_3PO_4 + 7\ CO_2 + 7\ H_2O$$

Sinteza este stopată după obținerea unei catene formată din 16 atomi de carbon deoarece *deacilaza*, enzimă hidrolitică ce îndepărtează grupele acil de pe ACP are o activitate maximă pentru acizi grași cu catena compusă din 16 atomi de carbon.

Prima reacție din procesul biosintezei acidului palmitic este catalizată de *acetil–CoA carboxilază*, enzimă cu rol important în reglarea biosintezei acizilor grași din celulele mamiferelor, drojdiilor și a majorității organismelor. Enzima conține vitamina B_7 (biotina) legată covalent de un rest ε al lizinei din apoproteina acesteia. Gruparea carboxil este inițial transferată pe centrul biotinic într-o etapă ce necesită ATP. Într-o a doua etapă, carboxilul este transferat carbonului din gruparea metilică a acetil-CoA. Cea mai studiată este acetil-CoA carboxilaza din *Escherichia coli*. Enzima conține trei proteine diferite: *proteina biotinică purtătoare de grupe carboxil*, (biotin carboxyl carrier protein – BCCP, cu M = 22.500), *carboxilaza biotinică* (M = 98.000) și *carboxiltransferaza* (M =

130.000). Mecanismul probabil de transfer al grupării carboxil este redat în fig. 5.5).

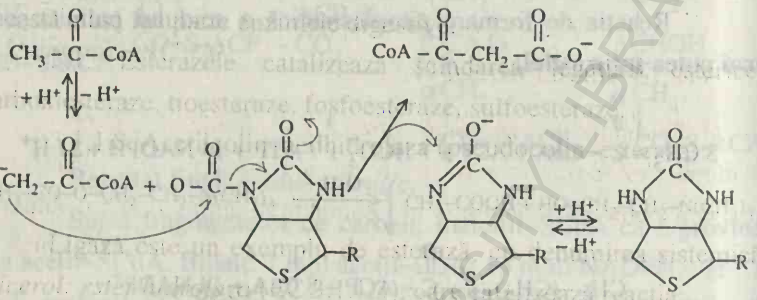


Fig. 5.5. Mecanismul carbanionic de carboxilare a acetil-CoA

Sistemul mitocondrial al sintezei acizilor graşi. Mitocondriile sintetizează acizi graşi din lanţurile acil existente şi din acetil~ScoA prin adăugarea acesteia la extremitatea carboxil terminală. Acizii graşi saturaţi cu C_{12} şi C_{16} sintetizaţi în citoplasmă sunt utilizaţi pentru alungirea lanţului atomilor de C sub formă de acil~ScoA. Mitocondriile pot utiliza şi malonil~ScoA pentru alungirea acil~ScoA prin adăugări succesive de resturi alcătuite din 2 atomi de carbon.

La nivelul microzomilor, deci pe reticulul endoplasmatic, alungirea lanţului de carbon se face utilizând cu precădere malonil~ScoA. Sistemul microsomal nu utilizează în această sinteză ACP.

Atât în mitocondrii cât şi în microzomi, drept sursă a atomilor de hidrogen necesari pentru reducerea dublelor legături din cetoacil~SCoA serveşte NADPH + H^+.

Biosinteza acizilor graşi nesaturaţi

Acizii graşi nesaturaţi se obţin prin dehidrogenarea acizilor graşi saturaţi la nivelul microzomilor din ficat şi din ţesutul adipos, în prezenţa unui sistem enzimatic care necesită NADH + H^+ şi oxigen. Dubla legătură se introduce în poziţia C_9.

Din acizii palmitic şi stearic se formează acizii nesaturaţi superiori cu o dublă legătură, acidul palmitoleic şi acidul oleic.

Oxigenaza localizată în fracţia microzomală a mamiferelor are o acţiune specifică şi determină dehidrogenarea în poziţia 9 faţă de grupa carboxil (Fig. 5.6). Pentru a se introduce o a doua dublă legătură, acidul palmitoleic format primeşte încă doi atomi de C la extremitatea carboxilică, prin condensarea palmitoleil~SACP cu malonil~SACP.

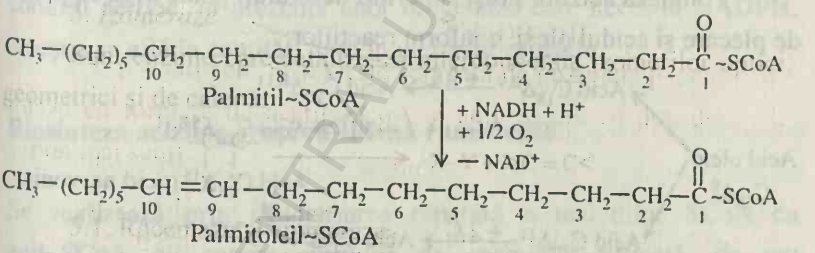
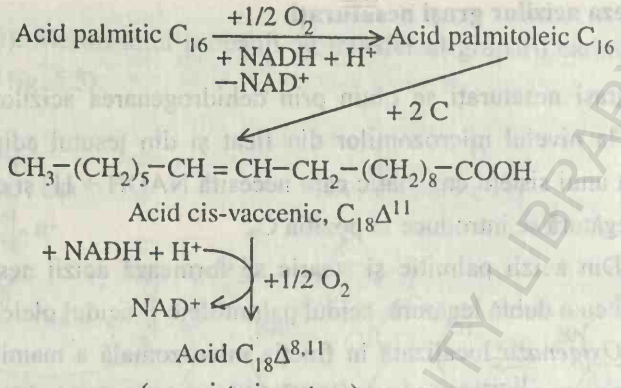


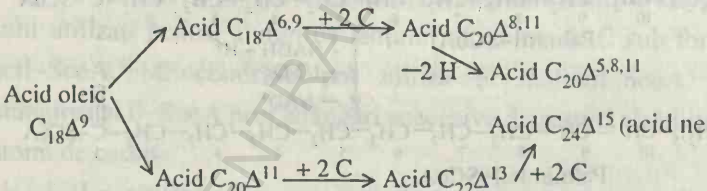
Fig. 5.6. Biosinteza acizilor grasi nesaturati

Deoarece, în acidul linolic, poziţia dublelor legături este $C_{18}\Delta^{9,12}$, acest acid nu poate fi sintetizat prin următorul mecanism:

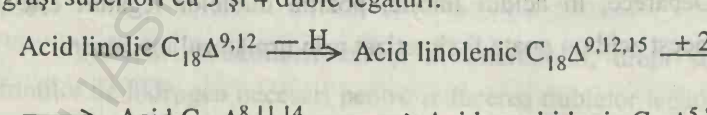


De asemenea, prin acest mecanism nu pot fi sintetizați acizii linolic ($C_{18}\Delta^{9,12}$), linolenic ($C_{18}\ \Delta^{9,12,15}$) și arachidonic ($C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$) care sunt acizi grași superiori esențiali și pe care organismele animale și-l procură exclusiv din hrana de origine vegetală.

Sinteza acizilor grași superiori nesaturați poate avea ca punct de plecare și acidul oleic, conform reacțiilor:



Prin alungirea catenei atomilor de carbon și prin reduceri succesive, acizii grași superiori nesaturați se pot transforma în acizi grași superiori cu 3 și 4 duble legături:



BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acizii graşi superiori polienici sunt utilizaţi de organismele animale pentru biosinteza prostaglandinelor şi sunt absolut necesari pentru dezvoltarea şi creşterea normală a animalelor. În lipsa lor, la şobolan, se constată apariţia dermatozelor şi îngroşarea pielii.

În ficatul şi în testiculele mamiferelor există un sistem enzimatic capabil să hidrogeneze acizii graşi superiori nesaturaţi, determinând astfel o transformare reciprocă a acizilor graşi.

Procesul decurge prin îndepărtarea a doi atomi de carbon de la extremitatea carboxil terminală:

Acid $C_{22}\Delta^{4,7,10,13,16} \longrightarrow$ Acid arachidonic $C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$

În prima fază se reduce dubla legătură C_4-C_5, după care se îndepărtează cei 2C.

La plantele superioare, acizii graşi superiori nesaturaţi esenţiali, acizii linolic şi linolenic, sunt sintetizaţi din acidul oleic în condiţii aerobe, în prezenţa unor oxigenaze care necesită NADPH. Aceştia se află în cantităţi mari în uleiurile vegetale.

Biosinteza acizilor graşi cu catenă ramificată

Se realizează prin condensarea repetată a malonilor SCoA cu acil~SCoA cu catena atomilor de carbon ramificată, de ex: izocapril~SCoA, izovaleril~SCoA (acceptori).

Degradarea acizilor graşi liberi

În plasma sanguină se află acizii palmitic, stearic şi oleic, fixaţi pe serum-albumine.

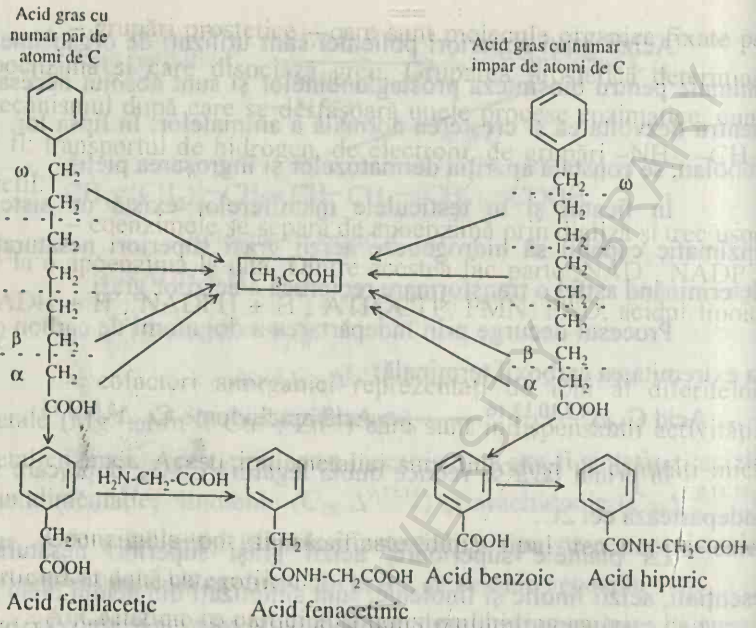


Fig. 5.7. Degradarea acizilor grasi dupa mecanismul β-oxidarii

Sursa principală a acizilor graşi liberi din plasmă o constituie trigliceridele ţesutului adipos care sunt hidrolizate de o lipază hormonosensibilă, enzimă intracelulară localizată în microzomii celulei adipoase (hidrolizează acizii graşi din poziţiile α,α' ale trigliceralilor) şi de o monoglicerid lipază (hidrolizează acidul gras din poziţia β).

Acizii graşi liberi o dată pătrunşi în circuitul sanguin sunt "captaţi" de ficat, de muşchii striaţi şi de ţesutul adipos.

Majoritatea ţesuturilor sunt capabile să oxideze acizii graşi cu formare de CO_2 şi H_2O, din care cauză acizii graşi sunt consideraţi forma cea mai activă metabolic a lipidelor.

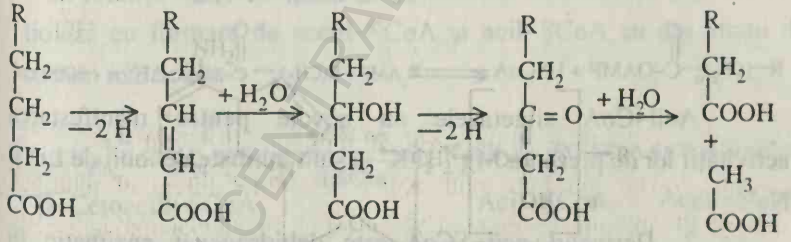
Degradarea acizilor graşi prin mecanismul β-oxidării

Acizii graşi sunt oxidaţi cu formare de CO_2 şi H_2O la nivelul mitocondriilor.

Teoria β-oxidării a fost elaborată de Knoop (1904) care a observat că prin hrănirea câinilor cu acizii graşi având o grupă fenil în poziţia ω se elimină prin urină următorii produşi de degradare: acid hipuric sau acid fenacetinic, în funcţie de numărul de atomi de carbon al acidului gras.

Pe baza acestor rezultate, Knoop ajunge la concluzia că, lanţul atomilor de carbon ai acidului gras transformat are de fiecare dată cu doi atomi de carbon mai puţin şi prin urmare, procesul de oxidare are loc la grupa $-CH_2-$ care se găseşte întotdeauna în poziţia β- faţă de carboxil.

Reprezentarea schematică a mecanismului degradării acizilor graşi după Knoop poate fi redată astfel:

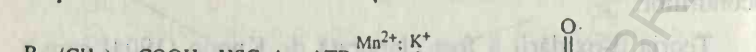


În felul acesta, din acidul stearic (C_{18}) se formează acidul palmitic (C_{16}), apoi acidul miristic (C_{14}) etc. până la formarea CO_2 şi H_2O.

S-a demonstrat că toţi produşii intermediari ai ß-oxidării acizilor graşi sunt derivaţi ai CoASH şi rolul acestei coenzime în

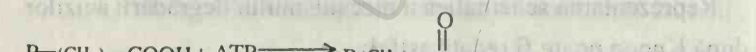
metabolismul acizilor graşi poate fi comparat cu rolul îndeplinit de gruparea fosfat în metabolismul glucidelor.

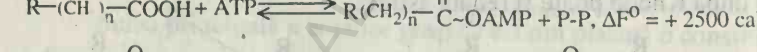
1. *Etapa iniţială* în oxidarea acizilor graşi constă în activarea lor prin formarea de acil derivaţi ai CoASH:



Reacţia este catalizată de acil CoA sintetaze. Dintre aceste sintetaze, acetil CoA sintetaza activează acizii graşi cu C_2 şi C_3, octanoil CoA sintetaza activează acizii graşi cu C_4-C_{12}, iar dodecanoil CoA sintetaza activează acizii graşi care conţin C_{10}-C_{18}. Acil~CoA sintetazele sunt localizate în membrana mitocondrială externă şi în reticulul endoplasmatic.

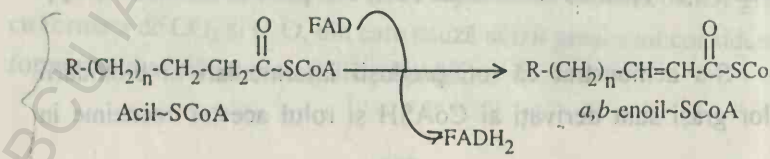
Reacţia de activare a acizilor graşi decurge în două etape, cu formarea unui produs intermediar *acil adenilat,* care este un compus macroergic:





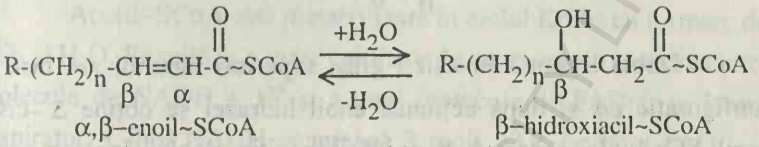
Acil~CoA sintetazele au nevoie pentru manifestarea activităţii lor de prezenţa Mg^{2+} şi K^+ şi sunt inhibate de ionii de Li^+ şi Na^+.

2. *Derivatul acil~SCoA* este dehidrogenat enzimatic în prezenţa acil CoA dehidrogenazelor, care conţin FAD drept coenzimă, cu formarea unui derivat α,β nesaturat:

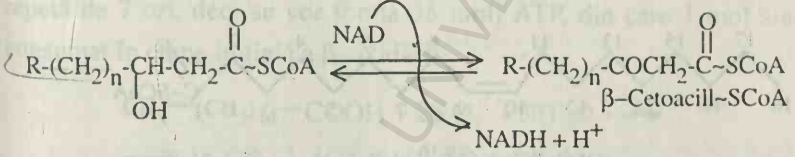


Dintre acil CoA s-au identificat: butiril–, octanoil– şi hexadecanoil–CoA dehidrogenaze, cu specificităţi de substrat deosebite.

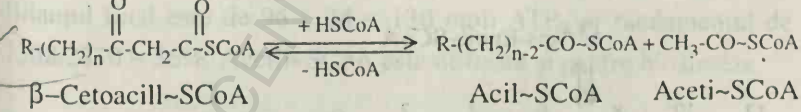
3. α,β–Enoil–CoA hidrazei (Enoil CoA hidrataza sau crotonaza = 3 hidroxiacil CoA hidrolaza) într-un β–hidroxiacil~SCoA, în cursul reacţiei:



4. β–Hidroxiacil–CoA este dehidrogenat de către β–hidroxiacil~SCoA dehidrogenază, cu formare de β–ceto acil~SCoA.



5. β–Ceto acil~SCoA este scindată de enzimele β–ceto acil–tiolaze cu formare de acetil~SCoA şi acil~SCoA cu doi atomi de carbon mai scurt:

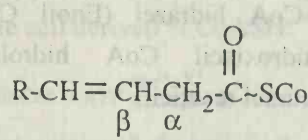


Echilibrele sunt deplasate spre dreapta.

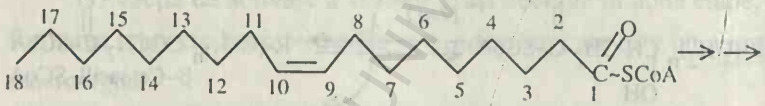
Formarea stereoizomerilor. Din reacţie rezultă acilderivaţi α,β–nesaturaţi cu configuraţie trans. Prin hidratare se formează L(+) β–oxiacil~SCoA.

Acizii graşi superiori nesaturaţi cu număr par de atomi de C sunt degradaţi după mecanismul β–oxidării până în faza când dubla

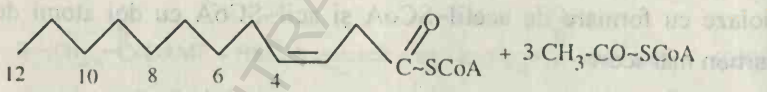
legătură din structura lor este situată între doi atomi de carbon vecini atomului de C la nivelul căruia urmează să fie scindată legătura covalentă:



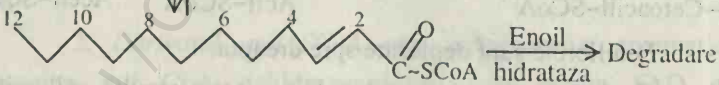
Dubla legătură în acizii graşi superiori naturali are însă o configuraţie *cis* şi după acţiunea enoil hidrazei se obţine Δ^3–cis–enoil~SCoA. În procesul β–oxidării poziţia dublei legături este întotdeauna Δ^2–trans–Enoil~SCoA. Din această cauză Δ^3–cis–enoil~SCoA este izomerizat de către Δ^3–cis–D^2–trans–enoil~SCoA



Oleil~SCoA ($\Delta^{9,10}$-cis)



$\Delta^{3,4}$-cis-Enoil~SCoA



$\Delta^{2,3}$-trans-Enoil~SCoA

izomerază cu formarea izomerului Δ^2–trans–Enoil~SCoA care este degradat prin β–oxidare.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ciclul Krebs şi β–oxidarea acizilor graşi

Mitocondriile sunt formaţiuni infracelulare care posedă echipamentele enzimatice necesare β–oxidării acizilor graşi şi ciclului lui Krebs.

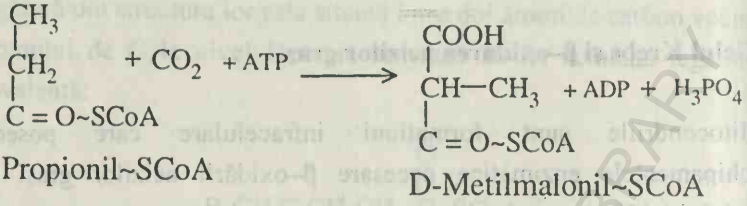
Acetil~SCoA este metabolizată în ciclul Krebs cu formare de CO_2 şi H_2O. Rezultă şi o mare cantitate de energie prin oxidarea unei molecule de NADH + H^+ şi a unei molecule de $FADH_2$ în lanţul respirator. 1 mol NADH generează 3 moli ATP, iar unul FAD – 2 moli ATP. Prin urmare pentru fiecare mol de acetil~SCoA se formează 5 moli ATP. În cursul oxidării acidului palmitic, procesul se repetă de 7 ori, deci se vor forma 35 moli ATP, din care 1 mol s-a consumat în etapa iniţială a β–oxidării.

$$CH_3—(CH_2)_{14}—COOH + 23\ O_2 + 30\ H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 16\ CO_2 + 46 H_2O \quad \Delta G^o = -2330{,}5\ cal$$

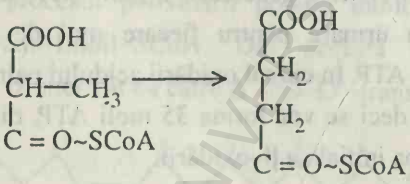
Cei 8 moli de acetil~SCoA rezultaţi din degradarea acidului palmitic sunt oxidaţi în ciclul Krebs cu formare de 8 x 12 = 96 moli ATP. Bilanţul final este de 96 + 34 = 130 moli ATP, iar randamentul de 1308/2330 = 56%. Acetil~SCoA este utilizată şi pentru biosinteze.

Degradarea acizilor graşi cu număr impar de atomi de carbon

Produsul final în acest caz este propionil~SCoA, care nu se întâlneşte în stare liberă deoarece este oxidat în continuare:

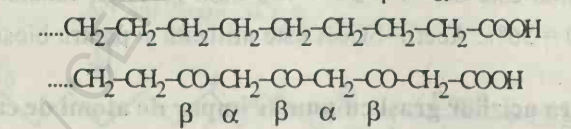


D–metilmalonil~SCoA sub acţiunea metilmalonil~SCoA racemazei este transformat în L–metil–malonil~SCoA mutază, enzimă care conţine cobamidă în calitate de coenzimă, în succinil~SCoA:



Geneza acetoacetatului, cetoza şi echilibrul acido–bazic

S-a emis teoria oxidării alternative multiple pentru a explica prezenţa corpilor cetonici.



Lanţul acidului gras este supus unei oxidări cu formare de grupări cetonice în poziţiile β faţă de grupa COOH.

Catena acidului gras este scindată ulterior cu formare de fragmente care conţin patru atomi de carbon, dând naştere fiecare la

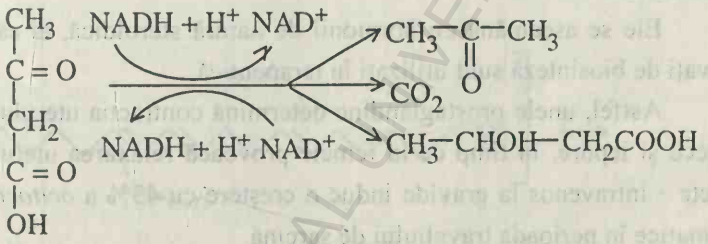
o moleculă de acetilacetat. Mecanismul a fost stabilit cu C^{14}, cele 2 molecule de acid acetilacetic având ambele izotopul radioactiv.

$$CH_3CO\sim SCoA + CH_3CO\sim SCoA \longrightarrow CH_3{-}CO{-}CH_2{-}CO\sim SCoA$$
$$\searrow$$
$$-2CoA\sim SH$$

Din acetil~SCoA se poate forma direct acid acetilacetic.

În continuare acidul acetilacetic este metabolizat cu formare de acetonă sau de acid β–hidroxibutiric:

În diabetul zaharat, în inaniție, intoxicații, crește mult concentrația corpilor cetonici.



Acidul acetic rezultat în procesul β–oxidării nu mai este degradat în ciclul Krebs din cauza unor cantități insuficiente de piruvat și oxalacetat care se formează în metabolismul glucidelor, dar care este încetinit.

În condițiile unei oxidări reduse "acetatul activat" se condensează cu formare de acetoacetat. Acumularea corpilor cetonici în sânge se numește *cetonemie*, eliminarea lor în urină – *cetonurie*, iar starea generală creată – *cetoză*.

Metabolismul şi acţiunea biologică a prostaglandinelor

Biosinteza prostaglandinelor se realizează din acizii graşi superiori esenţiali, acizii γ–linolenic, dihomo–γ–linolenic şi arachidonic.

Sistemul enzimatic care participă la sinteza prostaglandinelor se numeşte *prostaglandin sintetaza.* Biosinteza acestora se realizează în veziculele seminale. Sistemul enzimatic este legat de membrana microzomială.

Prostaglandinele au o activitate biologică relativ scurtă ca durată dar foarte intensă. După acţiunea lor, prostaglandinele sunt transformate în compuşi mai polari şi eliminate astfel pe cale ranală sau în fecale.

Ele se aseamănă cu hormonii de natură steroidică, ai căror derivaţi de biosinteză sunt utilizaţi în terapeutică.

Astfel, unele prostaglandine determină contracţia uterului la şoarece şi iepure, în timp ce la femeie provoacă relaxarea uterului. Injectate intravenos la gravide induc o creştere cu 43% a *ocitocinei* plasmatice în perioada travaliului de sarcină.

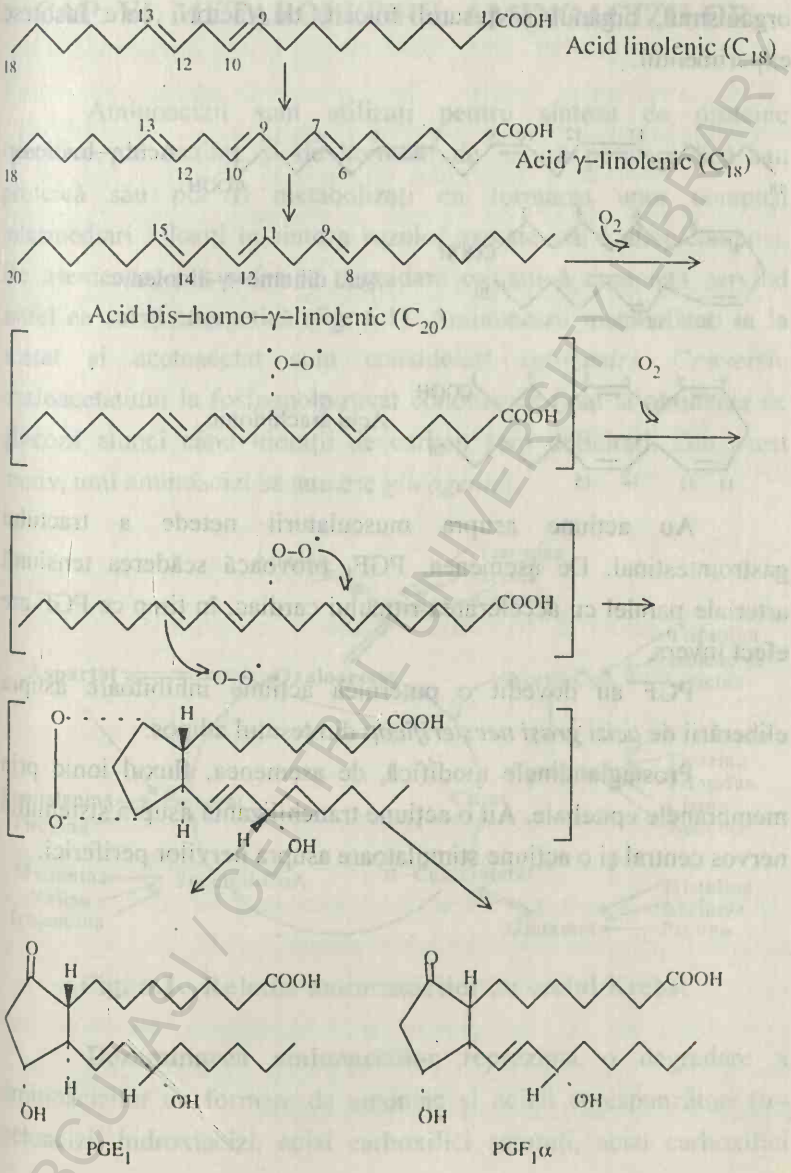
Mecanismul lor de acţiune se pare a fi direct, stimulând glanda hipofiză în procesul de eliberare a ocitocinei.

Cantităţi extrem de mici de prostaglandine administrate i.v. sau introduse direct în cavitatea uterină produc avortul spontan.

PGF_2 produce involuţia corpului galben.

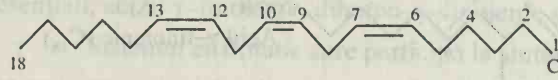
Prostaglandinele determină ovulaţia la numeroase specii, inclusiv la om.

Prostaglandinele au o acţiune multiplă şi diversificată în funcţie de natura şi doza utilizată, de calea de administrare ş: de

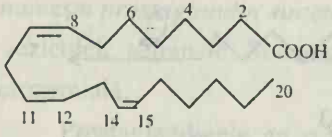


BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

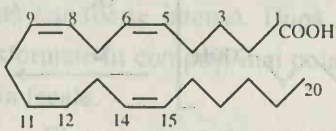
organismul, organul şi ţesutul folosit, de factorii care însoţesc experimentul.



Acid γ–linolenic



Acid dihomo–γ–linolenic



Acid arachidonic

Au acţiune asupra musculaturii netede a tractului gastrointestinal. De asemenea, PGF_1 provoacă scăderea tensiunii arteriale paralel cu accelerarea ritmului cardiac, în timp ce PGF are efect invers.

PGF au dovedit o puternică acţiune inhibitoare asupra eliberării de *acizi graşi neesterificaţi* din ţesutul adipos.

Prostaglandinele modifică, de asemenea, fluxul ionic prin membranele epiteliale. Au o acţiune tranchilizantă asupra sistemului nervos central şi o acţiune stimulatoare asupra nervilor periferici.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAP. VI. METABOLISMUL AMINOACIZILOR

Aminoacizii sunt utilizați pentru sinteza de proteine specifice, de enzime și de hormoni de natură polipeptidică sau proteică sau pot fi metabolizați cu formarea unor compuși intermediari folosiți în sinteza bazelor azotate sau a altor compuși. De asemenea, pot suferi o degradare oxidativă completă servind astfel ca sursă energetică (fig. 6.1). Aminoacizii metabolizați la la acetat și acetoacetat sunt considerați *cetogenici.* Conversia oxaloacetatului la fosfoenolpiruvat conduce în final la obținerea de glucoză atunci când hidrații de carbon sunt deficitari. Din acest motiv, unii aminoacizi se numesc *glicogenici.*

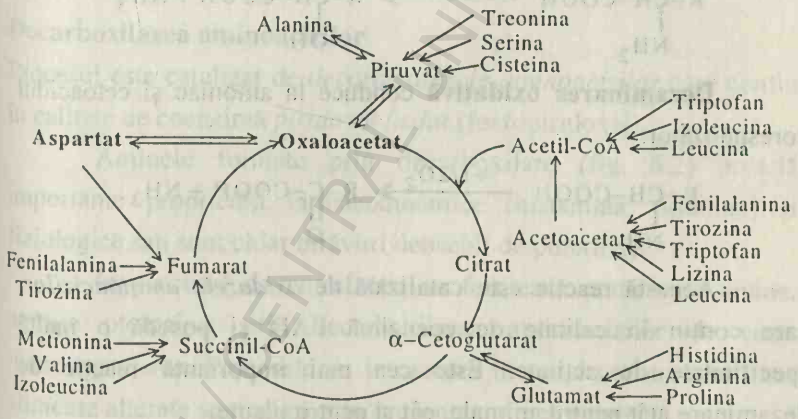
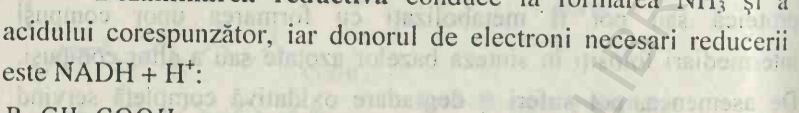


Fig. 6.1. Relatia aminoacizilor cu ciclul Krebs.

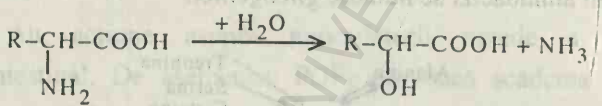
Dezaminarea aminoacizilor reprezintă o degradare a aminoacizilor cu formare de amoniac și acizii corespunzători (α–cetoacizi, hidroxiacizi, acizi carboxilici saturați, acizi carboxilici

nesaturați). Produșii rezultați în urma dezaminării aminoacizilor sunt ulterior metabolizați în celulă, fiind utilizați în procese de biosinteză a altor constituienți celulari, fie degradați în scopul procurării energiei necesare întreținerii proceselor biochimice.

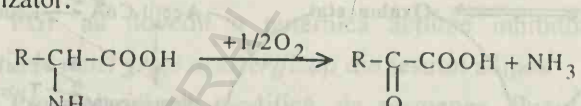
Dezaminarea reductivă conduce la formarea NH_3 și a acidului corespunzător, iar donorul de electroni necesari reducerii este NADH + H^+:



Dezaminarea hidrolitică are loc cu formare de amoniac și un hidroxiacid:

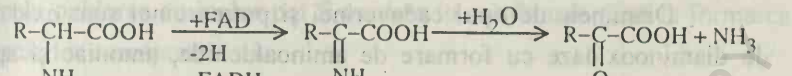


Dezaminarea oxidativă conduce la amoniac și cetoacidul corespunzător:



Această reacție este catalizată de *oxidazele aminoacizilor*, care conțin în calitate de coenzimă FAD și posedă o înaltă specificitate de acțiune. Este cea mai importantă reacție de dezaminare atât pentru animale, cât și pentru plante.

Reacția de dezaminare oxidativă decurge în două etape: în prima etapă are loc un proces de dehidrogenare cu formarea iminoacidului corespunzător, iar în faza a doua are loc adiția apei, cu formare de amoniac și cetoacidul corespunzător.



Aminoacid Iminoacid Cetoacid

Există două tipuri de flavoproteine cu activitate dehidrogenazică. În reticulul endoplasmatic este localizată *L–aminoacid oxidaza,* iar în microzomii celulelor hepatice se află *D–aminoacid oxidaza.*

Flavinnucleotidele acestor oxidaze ($FADH_2$ şi $FMNH_2$) reacţionează direct cu oxigenul molecular, generând H_2O_2 care este la rândul său descompusă în apă şi oxigen sub influenţa catalazei. Acest proces enzimatic are loc în peroxizomii celulelor hepatice.

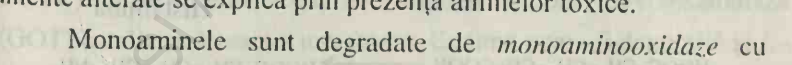
Decarboxilarea aminoacizilor

Procesul este catalizat de *decarboxilazele aminoacizilor* care conţin în calitate de coenzimă *piridoxal fosfat* (fosfopiridoxal).

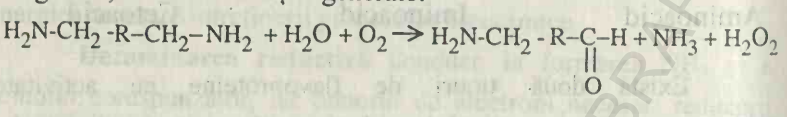
Aminele formate prin decarboxilare (fig. 6.2) posedă importante proprietăţi farmacodinamice (histamina, tiramina) şi fiziologice sau sunt chiar otrăvuri deosebit de puternice.

În procesul de putrefacţie se formează numeroase amine, numite ptomaine, prin decarboxilarea aminoacizilor de către microorganisme. Procesele de intoxicare în cazul consumului unor alimente alterate se explică prin prezenţa aminelor toxice.

Monoaminele sunt degradate de *monoaminooxidaze* cu formare de aldehide, amoniac şi apă oxigenată:



. Diaminele de tipul cadaverinei şi putresceinei sunt oxidate de diaminooxidaze cu formare de aminoaldehide, amoniac şi apă oxigenată, conform ecuaţiei generale:



Aminele formate prin decarboxilarea aminoacizilor în plante sunt utilizate pentru biosinteza alcaloizilor, iar aldehidele rezultate

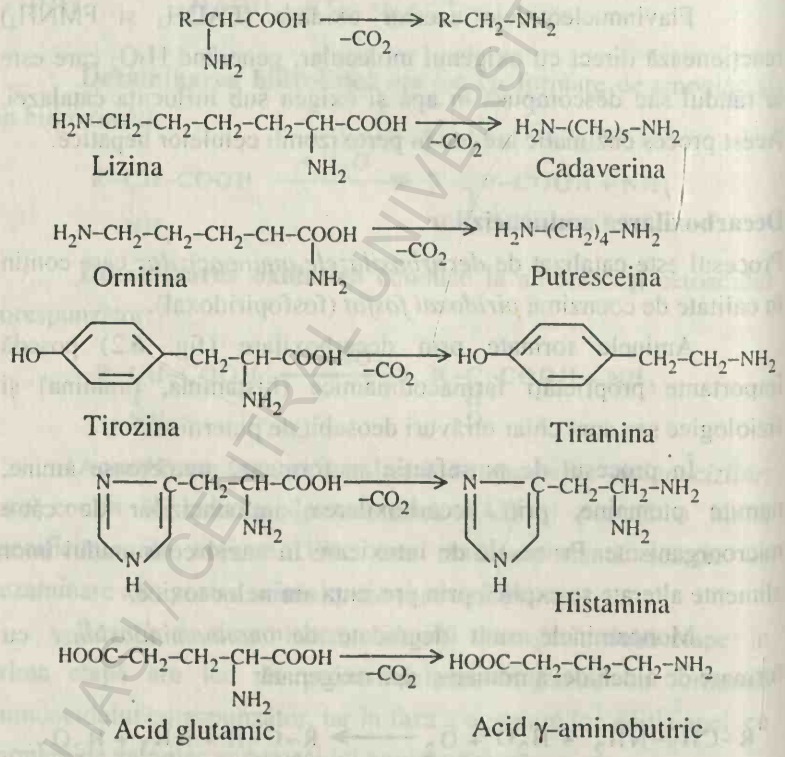


Fig. 6.2. Decarboxilarea aminoacizilor

prin oxidarea aminelor pot fi oxidate în continuare până la formarea acizilor corespunzători.

Transaminarea aminoacizilor

Reacțiile de transaminare sunt larg răspândite în celulele plantelor și animalelor. Din cei 22 de aminoacizi frecvent întâlniți în celulă, un număr de 11 (Ala, Phe, Trp, Tyr, Val, Arg, Asn, Cys, Ile, Lys) sunt în mod obișnuit transaminați enzimatic.

Reacțiile de transaminare sunt catalizate de *aminotransferaze* care conțin fosfopiridoxal și sunt reacții reversibile a căror constantă de echilibru este aproximativ 1.

Cele mai importante sunt: *alanin transaminaza* care catalizează reacții de tipul:

α -Aminoacid + Acid piruvic $\rightleftarrows$ α- Cetoacid + Alanina

și *glutamat transaminaza:*

α-Aminoacid + Acid Cetoglutaric $\rightleftarrows$ α - Cetoacid + Acid glutamic

Acceptor al grupării amino a aminoacizilor poate servi și acidul oxalilacetic.

Transaminazele sunt localizate în mitocondrii și în partea solubilă a celulelor eucariote și rolul lor fiziologic este diferit.

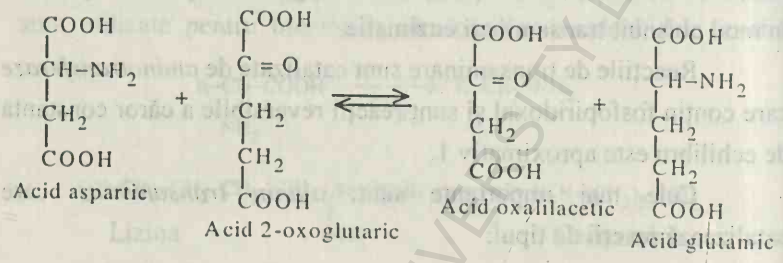
Enzima *L–aspartat : 2 oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.11.) cu denumirea veche de *glutamat oxaloacetat* transaminaza (GOT) catalizează reacția urmatoare. Enzima poate fi denumită și *L–aspartat aminotransferaza.*

Acid glutamic + Acid piruvic $\rightleftarrows$ Acid α- cetoglutaric + Alanina

Metabolismul alaninei

Biosinteza alaninei se realizează prin transaminarea acidului piruvic.

Din microorganisme s-a izolat în stare cristalină enzima *aspartat β–decarboxilaza* (M = 760.000, enzimă oligomeră cu 12-14 subunități, fiecare conținând un mol de fosfopiridoxal), care catalizează γ–decarboxilarea acidului aspartic cu formare de alanină.



β–Alanina este sintetizată în microorganisme prin α–decarboxilarea acidului aspartic pe cale enzimatică. În țesuturile mamif relor poate rezulta pe două căi diferite: degradarea bazelor pirimidinice citozină şi uracil (fig. 6.3), sau din propionil ~SCoA.

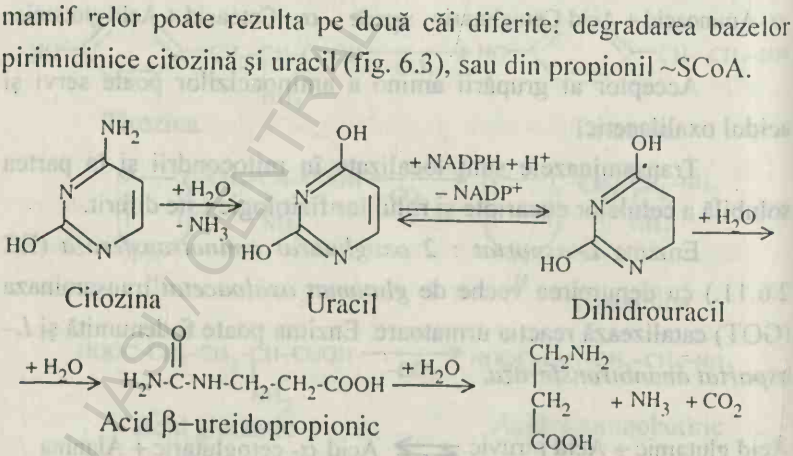
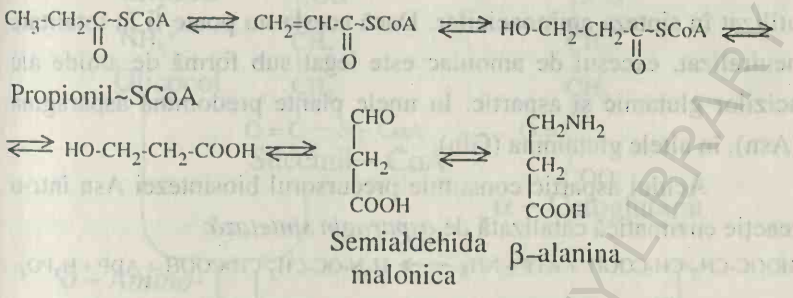
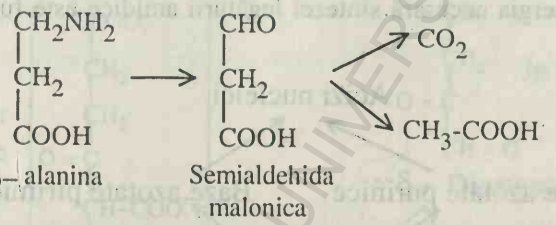


Fig. 6.3. Biosinteza β–alaninei



Catabolismul alaninei. β–alanina este degradată în plante cu formare de CO_2 şi acid acetic:



β–Alanina este utilizată în sinteza *coenzimei A* şi a *acidului pantotenic*.

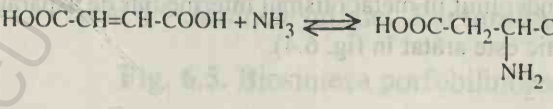
Metabolismul acidului aspartic realizează legătura între metabolismul proteinelor şi cel al glucidelor.

Acidul aspartic este sintetizat prin reacţia:

Acid glutamic + Acid oxaloacetic $\rightleftarrows$

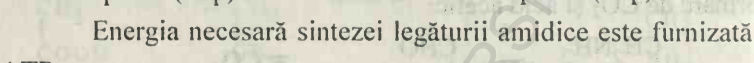
$\rightleftarrows$ Acid aspartic + Acid α- cetoglutaric

La plante, acidul aspartic poate rezulta şi din aminarea reductivă catalizată de *aspartat–amoniac liaza*:



Amoniacul, toxic pentru plante, este făcut inofensiv şi utilizat în sinteza aminoacizilor. Dacă acesta nu poate fi în totalitate neutralizat, excesul de amoniac este legat sub formă de amide ale acizilor glutamic şi aspartic. În unele plante predomină asparagina (Asn), în altele glutamina (Gln).

Acidul aspartic constituie precursorul biosintezei Asn într-o reacţie enzimatică catalizată de *asparagin sintetază*:



Acid aspartic (Asp) Acid aspartic (Asp)

Energia necesară sintezei legăturii amidice este furnizată de ATP.

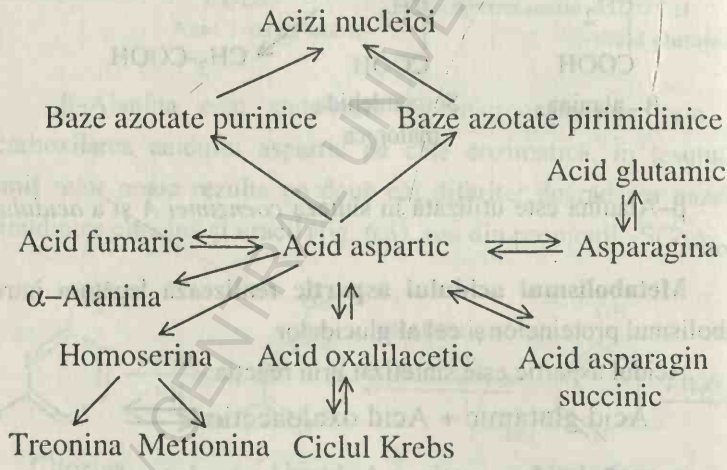


Fig. 6.4. Relatiile metabolice ale acidului aspartic

Rolul îndeplinit în metabolismul intermediar de asparagină şi de acidul aspartic este arătat în fig. 6.4).

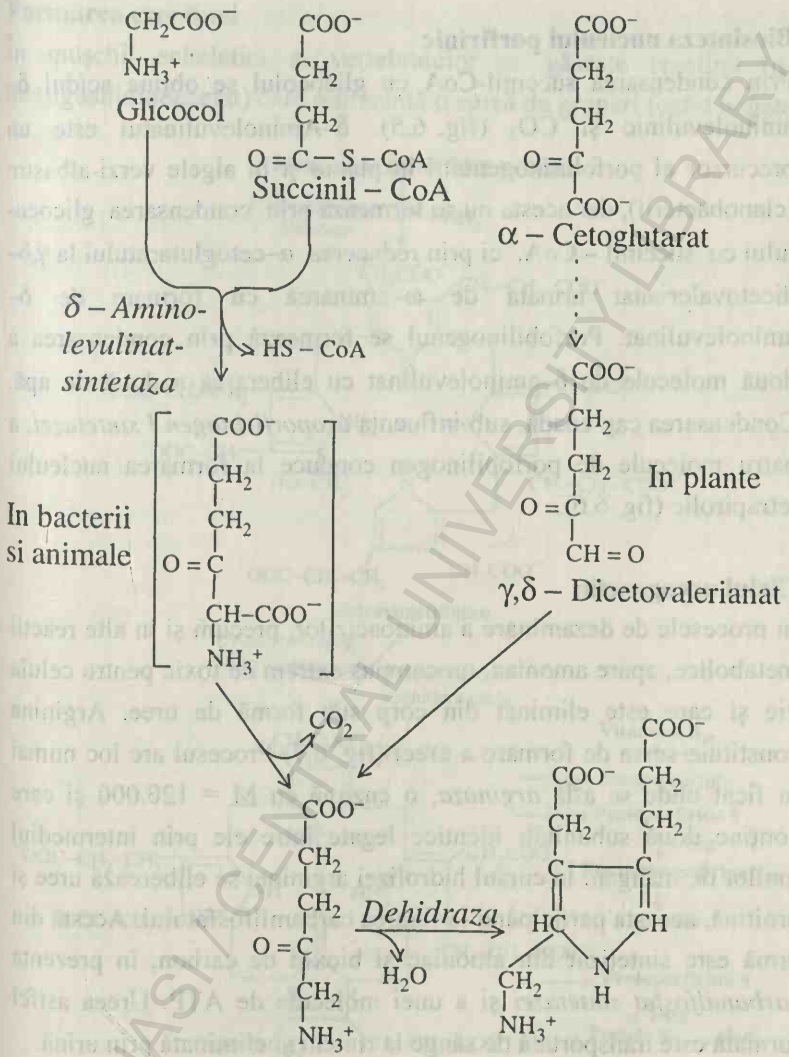


Fig. 6.5. Biosinteza porfobilinogenului

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biosinteza nucleului porfirinic

Prin condensarea succinil-CoA cu glicocolul se obține acidul δ–aminolevulinic și CO_2 (fig. 6.5). δ–Aminolevulinatul este un precursor al porfobilinogenului în plante și în algele verzi-albastre (cianobacterii), dar acesta nu se formează prin condensarea glicocolului cu succinil – CoA, ci prin reducerea α–cetoglutaratului la γ,δ–dicetovalerianat urmată de ω–aminarea cu formare de δ–aminolevulinat. Porfobilinogenul se formează prin condensarea a două molecule de δ–aminolevulinat cu eliberarea a două de apă. Condensarea cap-coadă, sub influența *uroporfirinogen I sintetazei*, a patru molecule de porfobilinogen conduce la formarea nucleului tetrapirolic (fig. 6.6).

Ciclul ureogenetic

În procesele de dezaminare a aminoacizilor, precum și în alte reacții metabolice, apare amoniac, un compus extrem de toxic pentru celula vie și care este eliminat din corp sub formă de uree. Arginina constituie sursa de formare a ureei (fig. 6.7) Procesul are loc numai în ficat unde se află *arginaza*, o enzimă cu M = 120.000 și care conține două subunități identice legate între ele prin intermediul ionilor de mangan. În cursul hidrolizei argininei se eliberează uree și ornitină, aceasta participând la fixarea carbamilfosfatului. Acesta din urmă este sintetizat din amoniac și bioxid de carbon, în prezența *carbamilfosfat sintetazei* și a unei molecule de ATP. Ureea astfel formată este transportată de sânge la rinichi și eliminată prin urină.

Formarea creatinei

În mușchii scheletici ai vertebratelor se găsește creatină (α-metilguanidinoacetat) care reprezintă o sursă de grupări fosfat bogate

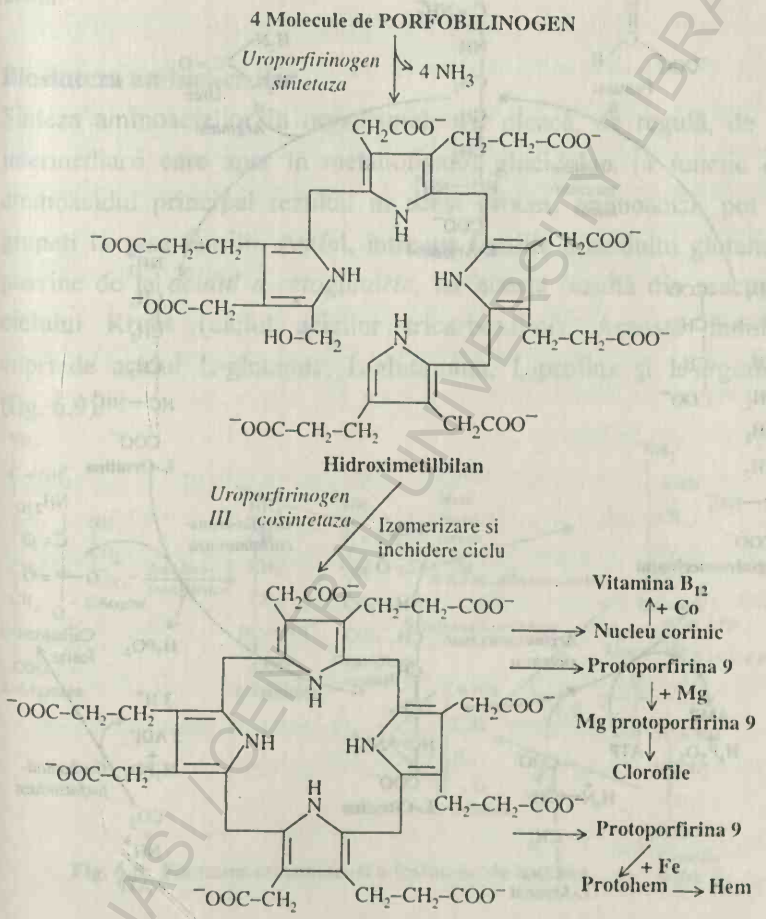


Fig. 6.6. Biosinteza tetrapirolilor

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în energie. Creatina este sintetizată plecând de la arginină, aminoacid ce transferă gruparea amidinică glicocolului (fig. 6.8).

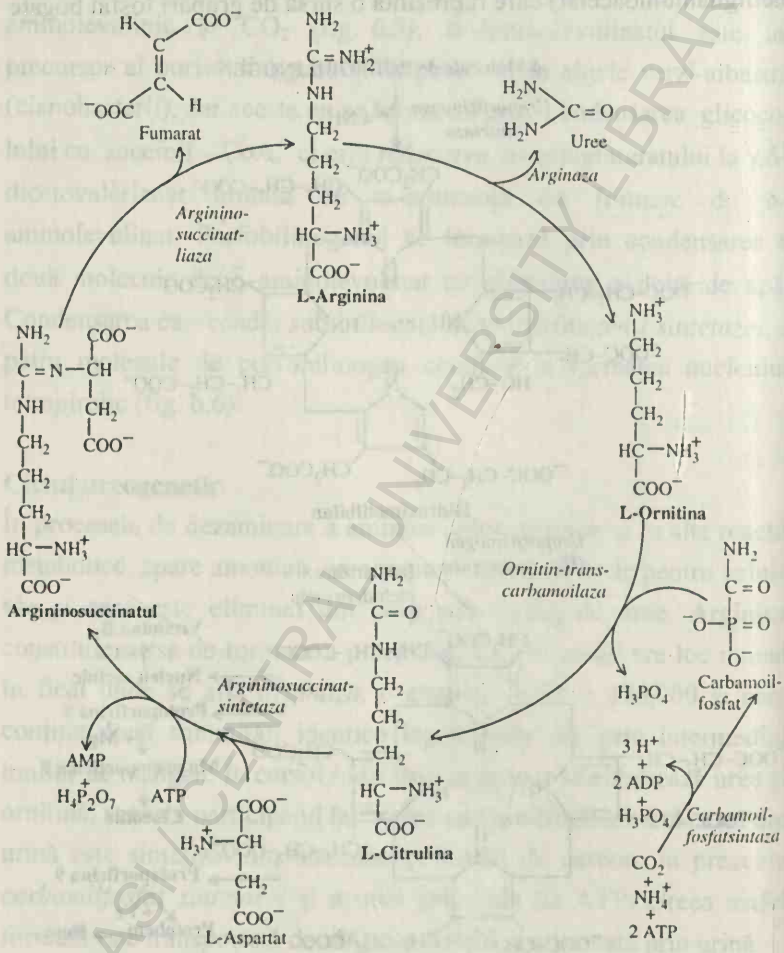


Fig. 6.7. Ciclul ureei. Mecanismul indepartarii azotului nedorit.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fosforilarea reversibilă a grupării aminice terminale conduce la compusul fosfocreatină, bogat în energie. Creatina este pierdută din corp prin ciclizare spontană la creatinină, care este excretată prin urină.

Biosinteza aminoacizilor

Sinteza aminoacizilor în organismele vii pleacă, de regulă, de la intermediarii care apar în metabolismul glucidelor. În funcție de aminoacidul principal rezultat în acest proces, aminoacizii pot fi grupați în șase familii. Astfel, întreaga familie a acidului glutamic provine de la *acidul α-cetoglutaric*, iar acesta rezultă din reacțiile ciclului Krebs (ciclul acizilor tricarboxilici). Această familie cuprinde acidul L-glutamic, L-glutamina, L-prolina și L-arginina (fig. 6.9).

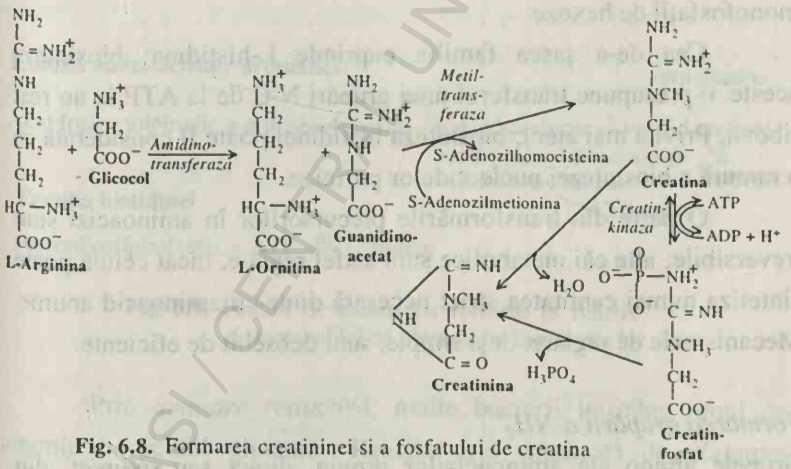


Fig. 6.8. Formarea creatininei și a fosfatului de creatina

În ciuperci și în *Euglena*, din acid α-cetoglutaric se obține lizină într-un număr de nouă etape de reacție.

Un alt intermediar al ciclului Krebs, acidul oxalilacetic, serveşte ca punct de plecare în sinteza acidului L-aspartic şi a membrilor familiei sale (fig. 6.9).

Acidul 3-fosfogliceric, ce apare în glicoliză, este intermediarul L-serinei, L-cisteinei şi glicocolului. De asemenea, acidul piruvic este substanţa de plecare în biosinteza alaninei, valinei şi leucinei. Totodată, acidul piruvic reprezintă o sursă de atomi de carbon în biosinteza lizinei plecând de la acid aspartic. În acest fel, atât lizina cât şi izoleucina pot fi consideraţi membri ai familiei acidului piruvic.

Aminoacizii aromatici provin din intermediarii cei mai importanţi ai glicolizei (acidul fosfoenolpiruvic) şi ai ciclului pentozelor (eritrozo-4-fosfatul). Triptofanul necesită de asemenea fosforibozilpirofosfat pentru sinteza sa, iar acesta derivă de la monofosfaţii de hexoze.

Cea de-a şasea familie cuprinde L-histidina; biosinteza acesteia presupune transferul unei grupări N-C de la ATP la un rest riboză. Privită mai atent, biosinteza histidinei poate fi considerată ca o ramură a biosintezei nucleotidelor purinice.

O parte din transformările precursorilor în aminoacizi sunt ireversibile; alte căi metabolice sunt astfel reglate, încât celula poate sintetiza numai cantitatea strict necesară dintr-un aminoacid anume. Mecanismele de reglare, deşi simple, sunt deosebit de eficiente.

Formarea grupării α-NH_2

Grupele amino ale aminoacizilor provin, direct sau indirect, din amoniac prin intermediul acidului glutamic.

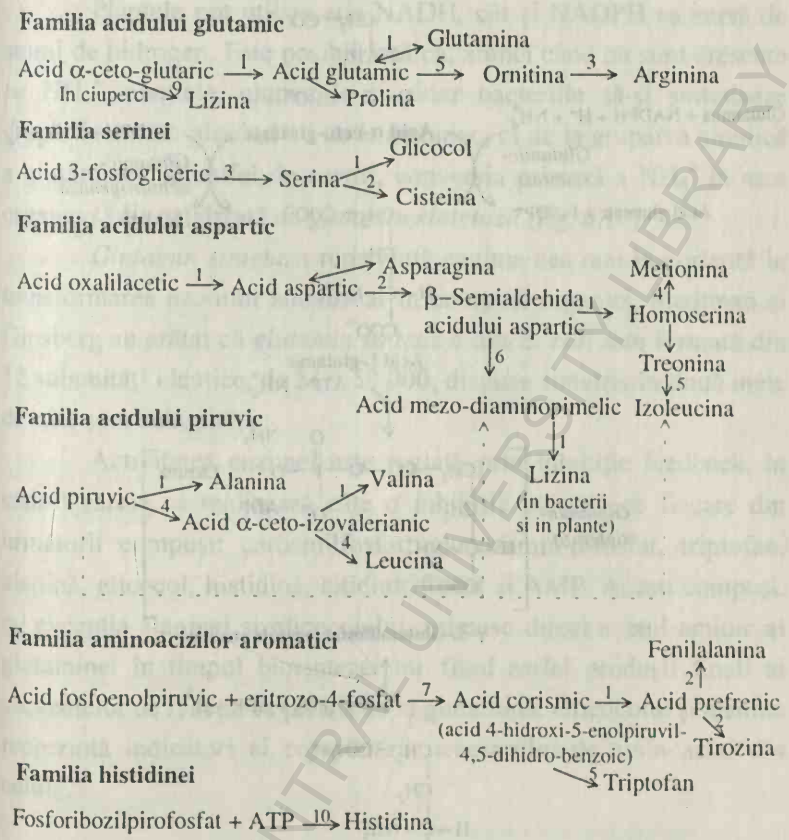


Fig. 6.9. Familii de aminoacizi formate in functie de metabolitul de plecare din biosinteza lor

Prin *aminare reductivă*, multe bacterii introduc ionul de amoniu în acidul glutamic. Reacția este catalizată de *glutamat dehidrogenaza* (fig. 6.10). Unele organisme posedă atât glutamat dehidrogenaza NAD/NADH-dependentă, cât şi NADP/NADPH-dependentă. În general, aceste reacții sunt reversibile. Totuşi, în

BCUMS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

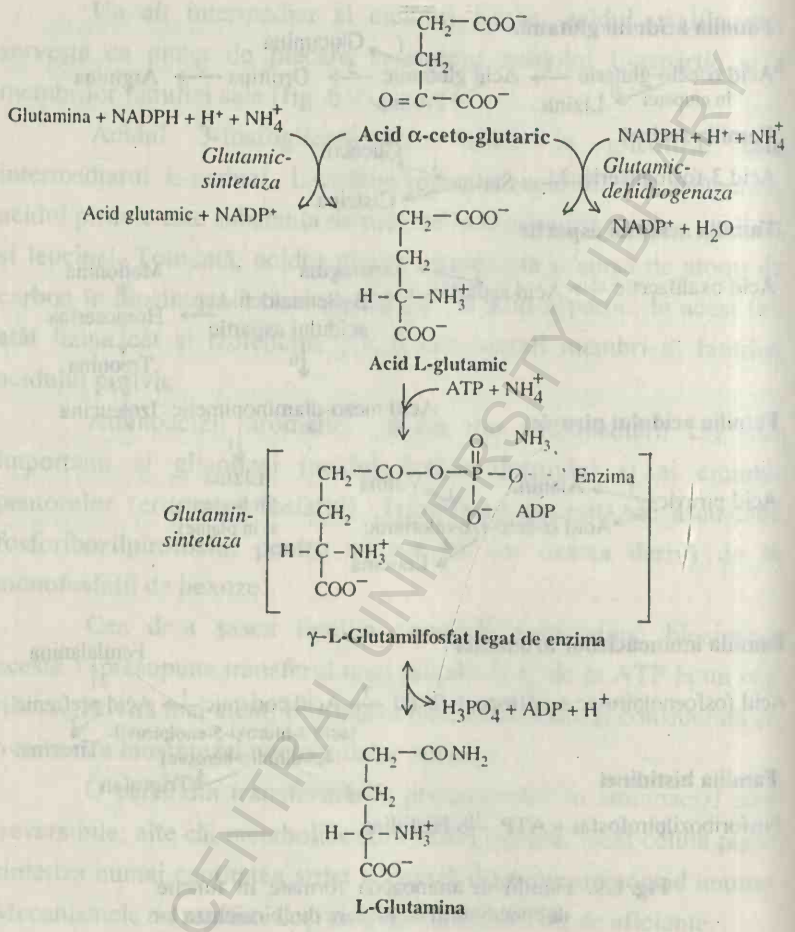


Fig. 6.10. Fixarea ionului de amoniu aflat in concentratii inalte in mediul de cultura in aminoacizi

anumite specii, reacțiile catabolice sunt inhibate de către ATP și CTP, precum și de către fosfatul de fructoză, fiind însă stimulate de AMP.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Plantele pot utiliza atât NADH, cât şi NADPH ca sursă de atomi de hidrogen. Este posibil însă ca, atunci când nu sunt crescute pe NH_4^+, plantele, ciupercile şi chiar bacteriile să-şi sintetizeze grupările amino plecând nu de la amoniac, ci de la gruparea amidică a glutaminei. În astfel de cazuri, conversia primară a NH_4^+ la azot organic să fie catalizată de *glutamin sintetază* (fig. 6.10).

Glutamin sintetaza reprezintă enzima cea mai importantă în transformarea azotului amoniacal în compuşi organici. Stadtman şi Ginsberg au arătat că *glutamin sintetaza* din *E. coli* este formată din 12 subunităţi identice, de M = 50.000, dispuse simetric în două inele de câte şase subunităţi.

Activitatea enzimei este reglată prin inhibiţie feedback, în cadrul căreia se realizează câte o inhibiţie parţială de fiecare din următorii compuşi: carbamilfosfat, glucozamin-6-fosfat, triptofan, alanină, glicocol, histidină, citidintrifosfat şi AMP. Aceşti compuşi, cu excepţia alaninei şi glicocolului, primesc direct azotul amidic al glutaminei în timpul biosintezei lor fiind astfel produşii finali ai secvenţelor de reacţie ce pleacă de la glutamină. Glicocolul şi alanina reprezintă indicatori ai completării necesarului de aminoacizi din celule.

Formarea ionului amoniu

Ionul amoniu poate fi încorporat uşor în aminoacizi, însă ele este mai greu de obţinut de către plante şi bacterii. De aceea, sub influenţa *nitrit şi nitrat reductazelor*, plantele îl obţin prin reducerea azotiţilor şi azotaţilor sau îl procură de la bacteriile fixatoare de azot.

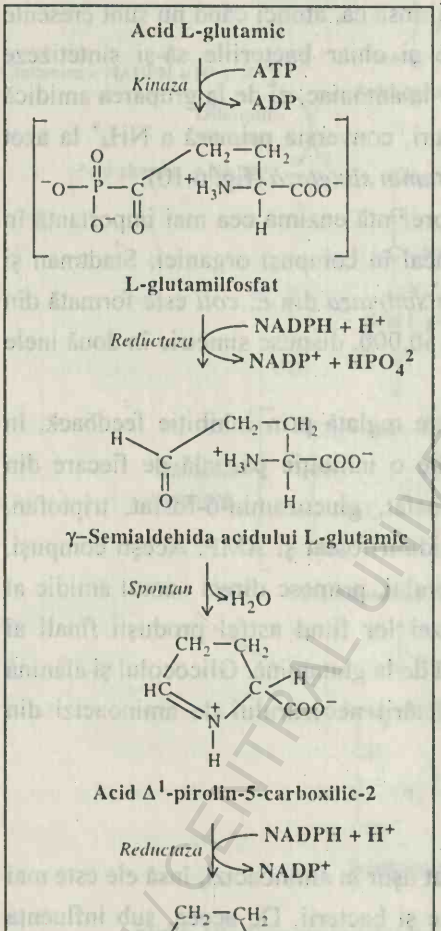


Fig. 6.11. Biosinteza prolinei

Fixarea azotului

Fixarea biologică a azotului de către bacteriile fixatoare de azot simbiotice se realizează cu ajutorul nitrogenazelor. Există două nitrogenaze proteice. Una este o proteină Mo-Fe, numită componentul I, iar a doua, componentul II, este o fero-proteină.

Feroproteina din *Clos-tridium pasteurianum* este un dimer, fiecare subunitate având M = 29.000 daltoni, care conține un nucleu de sulfură de fier cu patru atomi de fier şi patru de sulf, aceştia din urmă putând fi îndepărtați în mediu acid.

Mo-Fe-proteina este mult mai complexă şi mai puțin studiată. În bacteria *Clostridium pasteurianum* se găseşte un tetramer de 220.000 daltoni conținând 2 atomi de molibden, apro-

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ximativ 30 de fier şi tot atâţia de sulf care pot fi îndepărtaţi în mediu acid.

Fixarea azotului necesită 12 molecule de ATP şi şase echivalenţi de hidrogen pentru reducerea la potenţial scăzut a fiecărei molecule de N_2. Totodată, *Clostridium pasteurianum* consumă o cantitate de glucide cu 70% mai mare atunci când fixează azotul decât atunci când creşte pe un exces de ioni de amoniu.

În procesul de fixare a N_2, are loc reducerea feroproteinei de către feredoxină sau flavodoxină, obţinute în procesul de fermentaţie a glucidelor în *C. pasteurianum* sau în prezenţa unui raport ridicat de [NADPH]/[NADP]. Electronii sunt transferaţi de pe feroproteină pe Mo-Fe-proteină. Acest transfer este cuplat cu hidroliza a patru molecule de ATP la patru de ADP pentru fiecare pereche de electroni. Mo-Fe-proteina redusă va reduce mai departe N_2 la NH_4+.

Nitrogenaza poate fi studiată uşor deoarece ea poate reduce şi acetilena la etilenă care poate fi decelată gaz cromatografic. Totodată, nitrogenaza mai poate cataliza următoarele reacţii: transformarea CN^- în CH_4 şi NH_4^+, a N_2O la N_2 şi H_2O şi a H^+ la H_2.

Reducerea nitraţilor şi a nitriţilor

În procesul de reducere a nitriţilor şi a nitraţilor, aceştia joacă rolul de acceptori finali de electroni. Totodată, ei au un rol important şi în asimilaţie, în sensul că, în plante, bacterii şi ciuperci, nitritul obţinut din nitrat este redus la NH_4^+ cu o viteză aproximativ egală cu aceea cerută pentru sinteza compuşilor azotaţi în timpul creşterii. Reacţiile sunt catalizate de *nitrit şi nitrat reductaze* care sunt enzime solubile ce folosesc nucleotide piridinice reduse sau feredoxină redusă. Ionul de amoniu produs de bacteriile fermentative care utilizează nitrit ca

oxidant sau acela produs prin descompunerea materialelor organice este utilizat de plante şi bacterii pentru sintezele proprii de aminoacizi.

Biosinteze în familia acidului glutamic

a) Prolina

Acidul glutamic este fosforilat şi redus în continuare la semialdehida sa (fig. 6.11). Aceasta ciclizează spontan la acidul D^1-pirolin-5-carboxilic, care se reduce la prolină. În colagen se găseşte însă 4-hidroxiprolina, care nu poate fi sintetizată ca atare, ci provine dintr-o modificare posttranslaţionalală a resturilor de prolină din proteina precursor, protocolagenul. Enzima *prolin-hidroxilaza*este o oxidază cu funcţii mixte care necesită Fe^{2+} şi un agent reducător, cum ar fi acidul ascorbic. La reacţie mai participă şi acidul α-cetoglutaric care este decarboxilat oxidativ la acidul succinic, în proporţie echimoleculară cu resturile de prolină.

b) Biosinteza argininei

Dacă însă gruparea amino a acidului glutamic este acetilată, reacţia decurge cu formare de ornitină şi nu de prolină (fig. 6.12). Ornitina este convertită în arginină prin acelaşi ciclu de reacţii întâlnit la formarea ureei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

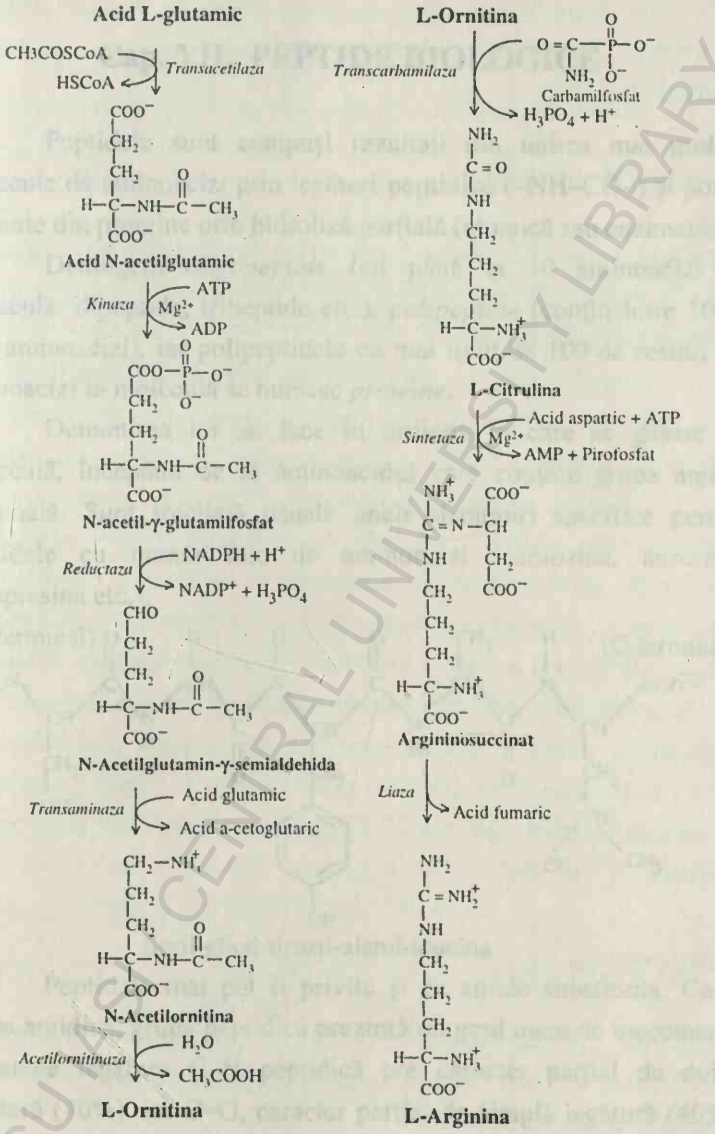
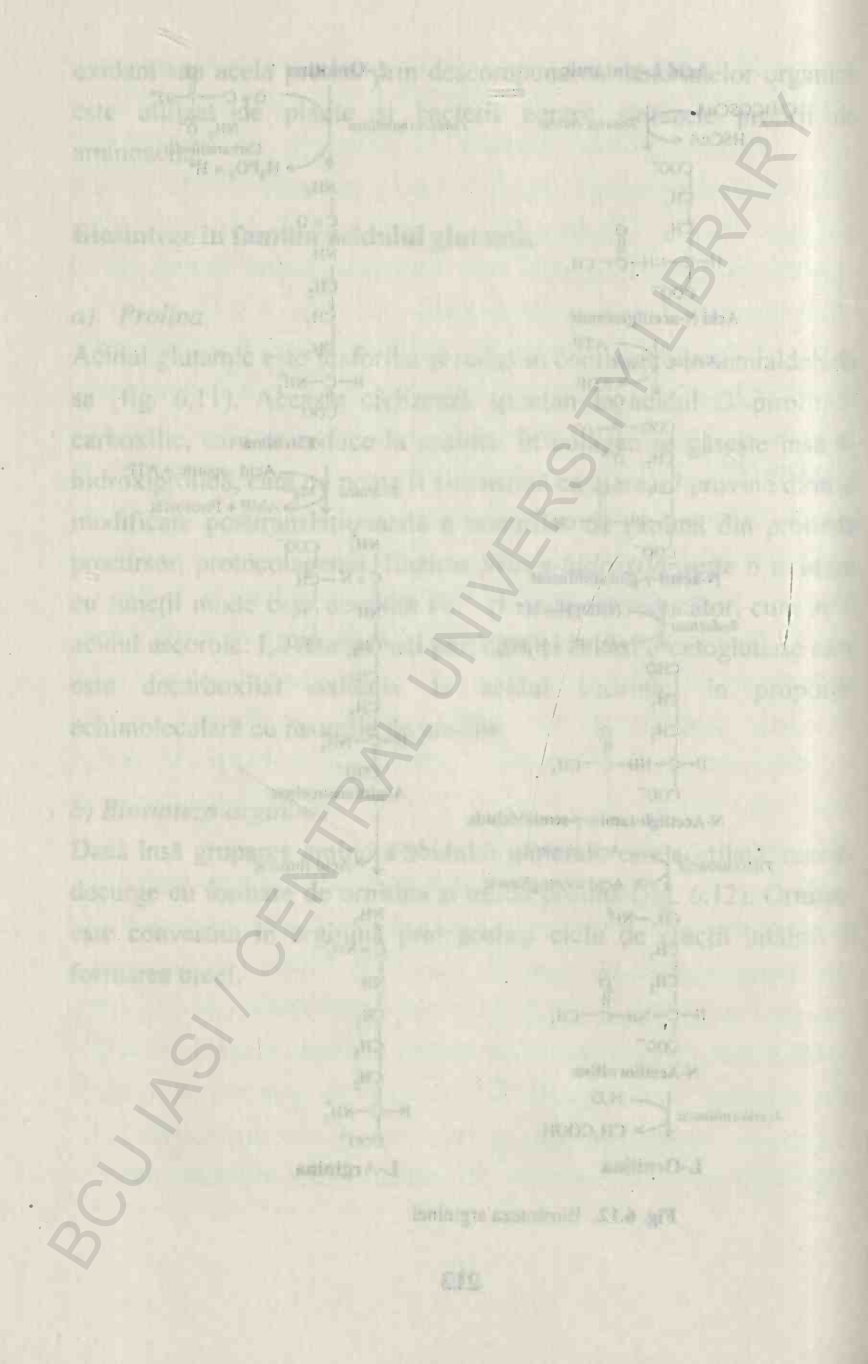


Fig. 6.12. Biosinteza argininei

BCU MAV CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



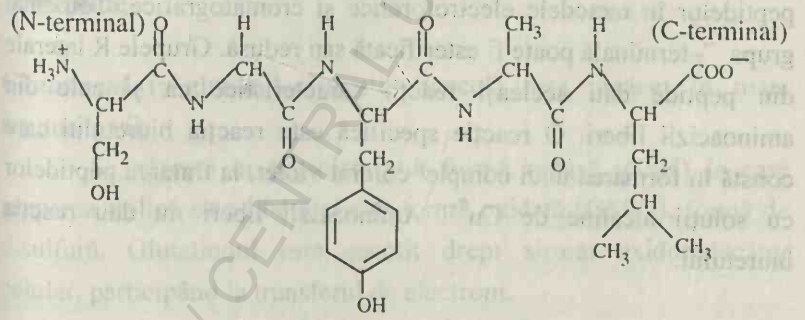
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. VII. PEPTIDE BIOLOGICE

Peptidele sunt compuşi rezultaţi din unirea mai multor molecule de aminoacizi prin legături peptidice (–NH–CO–) şi pot fi obţinute din proteine prin hidroliză parţială (chimică sau enzimatică).

Distingem *oligopeptide* (cu până la 10 aminoacizi în moleculă: dipeptide, tripeptide etc.), *polipeptide* (conţin între 10 şi 100 aminoacizi), iar polipeptidele cu mai mult de 100 de resturi de aminoacizi în moleculă se numesc *proteine.*

Denumirea lor se face în ordinea în care se găsesc în moleculă, începând de la aminoacidul care conţine grupa amino terminală. Sunt totodată uzuale unele denumiri specifice pentru peptidele cu număr mic de aminoacizi (carnozina, anserina, vasopresina etc.).



Seril-glicil-tirozil-alanil-leucina

Peptidele mai pot fi privite şi ca amide substituite. Ca şi grupa amidică, grupa peptidică prezintă un grad mare de mezomerie. Deoarece legătura C–N peptidică are caracter parţial de dublă legătură (40%), iar C=O, caracter parţial de simplă legătură (40%), grupa imino >NH are o tendinţă marcată de a se ioniza, iar grupa –

C–N– este relativ rigidă şi nu se poate roti liber, fapt deosebit de important pentru conformaţia tridimensională a lanţurilor polipeptidice.

Proprietăţile peptidelor

Peptidele, în special cele cu masă moleculară mică, sunt solubile în apă, insolubile în alcool absolut şi au caracter amfoter ca şi aminoacizii constituienţi.

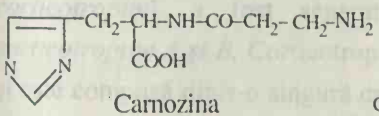
Grupele NH_2 şi COOH fiind mai îndepărtate decât în aminoacizi se vor influenţa mai puţin, ceea ce determină o aciditate mai slabă a grupei –COOH, în timp ce grupa NH_2 devine mai bazică.

Grupele amino N–terminale prezintă toate reacţiile caracteristice grupelor NH_2 din aminoacizi, inclusiv reacţia cu ninhidrină, care serveşte la detectarea şi evaluarea cantitativă a peptidelor în metodele electroforetice şi cromatografice. Totodată, grupa –terminală poate fi esterificată sau redusă. Grupele R laterale din peptide dau aceleaşi reacţii caracteristice ca şi cele din aminoacizii liberi. O reacţie specifică este reacţia biuretului care constă în formarea unui complet colorat violet, la tratarea peptidelor cu soluţii alcaline de Cu^{2+}. Aminoacizii liberi nu dau reacţia biuretului.

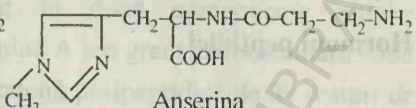
Dipeptide

Carnozina (β–alanil–histidina) este prezentă în muşchiul mamiferelor, iar *anserina* (β–alanil–N–metil–histidina) este prezentă în muşchiul păsărilor.

Carnozina are acțiune hipertensivă și, sub formă de carnozinfosfat, intervine în procesele de contracție musculară.

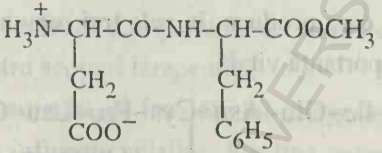


Carnozina



Anserina

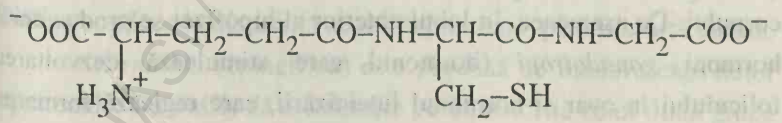
Aspartamul (Nutrasweet) este un produs sintetic, esterul metilic al L–Aspartil–L–Phenilalanina, de 200 ori mai dulce decât zahărul pe care îl înlocuiește uneori.



Tripeptide

Glutationul (γ–glutamil–cisteinil–glicocol) este prezent în toate țesuturile vii.

Se găsește în organism sub formă redusă (GSH) în care gruparea tiolică este liberă și sub formă oxidată (GSSG), formă de disulfură. Glutationul este socotit drept sistem oxidoreducător celular, participând la transferul de electroni.



γ–Glutamil–cisteinil–glicina

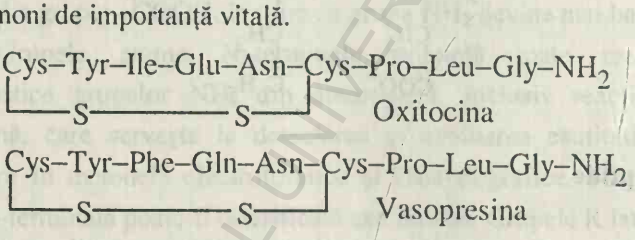
BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cantitatea de glutation sanguin descreşte cu vârsta, în special la nivel pupilar (cataractă senilă). În diabet, concentraţia glutationului este, de asemenea, scăzută.

Hormoni peptidici

Unii hormoni hipofizari şi pancreatici au o structură polipeptidică: oxitocina, vasopresina, insulina, glucagonul şi hormonul adenocorticotrop (ACTH).

Hipofiza este o glandă cu greutate de cca. 0,7g, situată la baza creierului şi care produce, în cele trei regiuni ale ei, un număr de hormoni de importanţă vitală.



Lobul anterior al hipofizei eliberează *hormonul tireotrop*, care stimulează secreţia glandei tiroide, *hormonul adrenocorticotrop* (ACTH), care stimulează secreţia hormonilor produşi de cortexul glandelor suprarenale, *hormonul luteotrop* sau *lactogen* (prolactina), care provoacă secreţia laptelui în glanda mamară şi *hormonul somatotrop* sau hormonul creşterii, care reglează dimensiunile corpului. De asemenea, în lobul anterior al hipofizei se produc cei 2 hormoni *gonadotropi* (hormonul care stimulează dezvoltarea foliculului în ovar şi hormonul luteinizării, care reglează formarea carotinoidelor în ovar şi producerea hormonilor sexuali masculini). Lobul posterior al hipofizei secretă *oxitocina*, cu rol în contracţia

uterului la naştere şi *vasopresina*, hormonul *antidiuretic*, capabil să provoace creşterea presiunii arteriale.

Hormonul adrenocorticotrop (ACTH), numit şi *corticotropină*, a fost separat în două componente numite *corticotropine A şi B*. Corticotropina A are greutate moleculară 4567 şi este compusă dintr-o singură catenă polipeptidică de 39 resturi de aminoacizi, cu serină la marginea aminică şi fenilalanină la marginea carboxilică. Corticotropina B provine din corticotropina A prin pierderea a 11 resturi de aminoacizi de la marginea carboxilică; ea posedă numai 28 aminoacizi în catena ei.

ACTH se izolează din glandele de animale, iar oxitocina se obţine sintetic pentru scopuri terapeutice.

Insulina, secretată de insulele lui Langerhans, a fost izolată în stare pură. Sub influenţa acizilor, insulina suferă denaturare, dar bazele regenerează forma iniţială, fiziologic activă. Agenţii care desfac legăturile S–S denaturează ireversibil insulina. Insulina formează compuşi cu metalele bivalente; din pancreas se izolează de obicei compusul cu ioni de zinc, frumos cristalizat. Insulina este digerată de pepsină şi chimotripsină, dar slab atacată de tripsină.

Diabetul se datorează unei insuficienţe în insulină şi se manifestă prin creşterea concentraţiei glucozei în sânge peste limita normală. Apare glucoză în urină (glucozurie), iar în unele forme de diabet apar acid acetilacetic şi acetonă în sânge (acidoză). Injectată, insulina conduce la dispariţia acestor simptome, pentru scurtă durată.

Adrenalina (epinefrina) este produsă de măduva capsulelor suprarenale. Cu $FeCl_3$ dă o coloraţie verde datorită celor două grupe OH. Structura sa a fost stabilită prin sinteză (fig. 7.1).

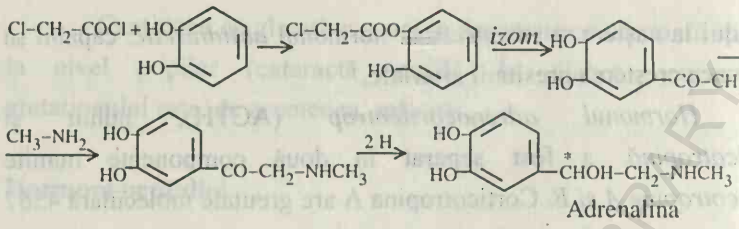


Fig. 7.1. Sinteza industriala a adrenalinei

Adrenalina este levogiră, iar produsul sintetic se separă în cei doi enantiomeri, cu ajutorul acidului (+)–tartric. Prin încălzire izomerul dextro racemizează şi este din nou scindat obţinându-se astfel încă o cantitate de produs levogir.

Adrenalina acţionează asupra organismului animal, îngustând vasele sanguine şi provocând o mărire a tensiunii arteriale, lărgind pupila, accelerând bătăile inimii şi inhibând mişcările stomacului si ale intestinului. Efectele sunt antagoniste celor produse de acetilcolină.

În doze mici provoacă o creştere a concentraţiei glucozei în sânge, producând glucozurie. Serveşte în chirurgie pentru a opri hemoragiile (vasoconstrictor).

Efectele adrenalinei sunt de foarte scurtă durată, deoarece ea este repede oxidată mai ales în ficat.

Biochimia acţiunii hormonilor

Sinteza şi eliberarea hormonilor este controlată în mod ierarhic, implicând trei etape succesive ale interacţiei hormon–celulă ţintă.

1. *Hipotalamusul* (situat la baza creierului) primeşte mesaje nervoase specifice şi secretă hormoni numiţi *factori de eliberare* (releasing factors), care trec prin vasele de sânge până la glanda

hipofiză anterioară.

2. *Hipofiza* este stimulată să secrete un hormon specific (fig. 7.2). Astfel, factorul de eliberare al tireotropinei (TRF) stimulează eliberarea hormonului tireotrop (TSH), iar factorul de eliberare al corticotropinei (CRF) produce eliberarea hormonului adrenocorticotrop (ACTH).

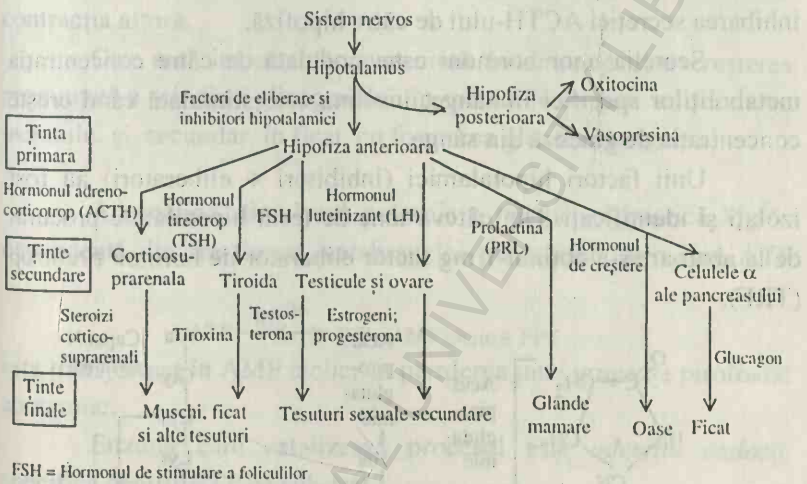


Fig. 7.2. Organizarea ierarhica a reglarii endocrine

Hipotalamusul mai secretă şi *factori inhibitori*, care inhibă eliberarea unor hormoni hipofizari.

Hormonii hipofizari trec prin sistemul sanguin la glandele ţintă specifice. Ţinta ACTH-ului este cortexul suprarenal, iar cea a hormonului tireotrop este glanda tiroidă.

3. Glandele ţintă, mai ales gonadele sunt stimulate pentru a produce hormoni proprii, care acţionează asupra unor ţinte finale.

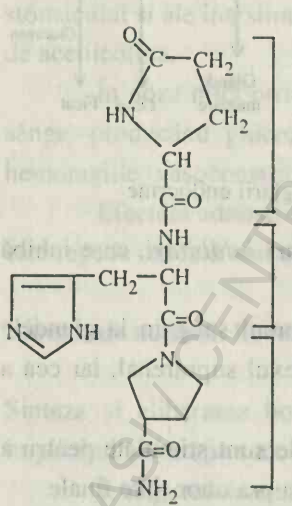
Hipotalamusul eliberează *oxitocină* şi *vasopresină*, importanţi pentru reglarea lactaţiei, respectiv a echilibrului apei.

Aceşti hormoni trec în hipofiza posterioară, se leagă de *neurofizine* (proteine mici), de unde sunt eliberaţi în sânge.

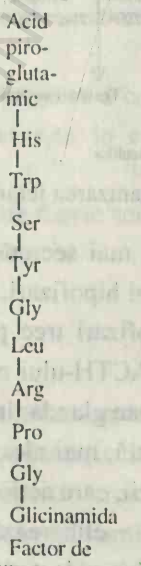
Secreţia hormonilor tropi din hipofiza anterioară este reglată printr-o relaţie feed-back de către secreţiile caracteristice ale glandelor ţintă. De pildă, o concentraţie crescută în sânge a hormonilor glucocorticoizi secretaţi de corticosuprarenală induce inhibarea secreţiei ACTH-ului de către hipofiză.

Secreţia unor hormoni este modulată de către concentraţia metaboliţilor specifici în sânge; insulina este stimulată când creşte concentraţia de glucoză din sânge.

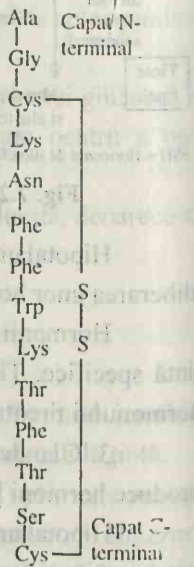
Unii factori hipotalamici (inhibitori + eliberatori) au fost izolaţi şi identificaţi. Din câteva tone de ţesut hipotalamic procurat de la abatoare s-a obţinut 1 mg factor eliberator de hormon tireotrop (TRF).



Factor de eliberare a tireotropinei



Factor de eliberare a LH



Factor de inhibare a hormonului de creştere

BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rolul adrenalinei

Secreţia adrenalinei în sânge declanşează o serie de răspunsuri care pregătesc organismul animal pentru "fugă sau atac". Acesta include creşterea presiunii sanguine, a ritmului şi debitului cardiac şi efectele caracteristice asupra muşchilor netezi, implicând relaxarea unora şi contracţia altora.

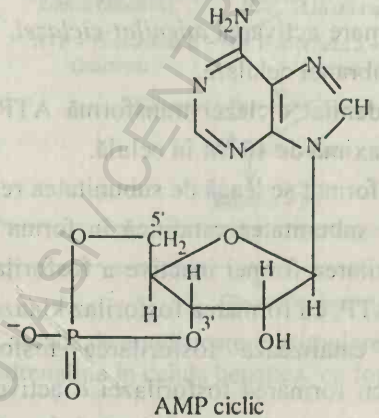
Cea mai importantă consecinţă biochimică este creşterea pronunţată a scindării glicogenului, în special în muşchi, cu formarea lactatului şi, secundar, în ficat, cu formarea glucozei sanguine.

Adrenalina stimulează puternic o reacţie enzimatică Mg^{2+}–dependentă din fracţiunea membranelor plasmatice, prin care ATP

$$ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} 3',5'\text{– AMP ciclic} + PPa$$

este transformat în AMP ciclic, cu pierderea unei grupe de pirofosfat anorganic.

Enzima care catalizează procesul este *adenilat ciclază*, specifică pentru ATP ca substrat.



Al doilea mesager

AMP ciclic

S-a găsit o enzimă *fosforilaz–kinaz–kinază,* numită simplu *protein–kinază* care are o formă inactivă şi una activă.

Forma sa activă catalizează fosforilarea fosforilaz-kinazei inactive de către ATP, dând forma fosforilată activă.

Protein-kinaza poate fosforila şi alte proteine, cum sunt proteinele din membrane.

Concentraţia AMP ciclic creşte rapid şi semnificativ în ficat după legarea adrenalinei, în timp ce, după îndepărtarea sau distrugerea sa, AMP ciclic din ficat scade brusc la valori foarte mici. Enzima răspunzătoare de distrugerea AMP ciclic este *fosfodiesteraza,* care catalizează reacţia:

$$\text{AMP ciclic} + H_2O \longrightarrow \text{Adenozin–5'–fosfat}$$

Aceasta este stimulată de Mg^{2+} şi inhibată specific de cafeină şi teofilină, alcaloizi prezenţi în cafea şi ceai.

Adrenalina, ajungând la suprafaţa celulei hepatice în conc. de 10^{-8}–10^{-10}M se leagă de receptorii specifici ai adrenalinei de pe suprafaţa exterioară a membranelor celulelor hepatice (fig. 7.3). Legarea lor produce o midificare conformaţională locală în membrană, care are ca urmare activarea *adenilat-ciclazei,* localizată pe suprafaţa internă a membranei celulare.

Forma activă a adenilat ciclazei transformă ATP în AMP ciclic, cu o concentraţie maximă de 10^{-6}M în celulă.

AMP ciclic astfel format se leagă de subunitatea reglatoare a protein kinazei, eliberând subunitatea catalitică în forma ei activă. Aceasta catalizează fosforilarea formei inactive a fosforilaz kinazei pe seama consumului de ATP, cu formarea fosforilaz kinazei active.

Această enzimă catalizează fosforilarea fosforilazei *b* inactive pe seama ATP, cu formarea fosforilazei *a* active, care, la rândul ei, catalizează scindarea glicogenului până la glucozo–1–

fosfat; această se transformă în glucozo–6–fosfat şi apoi în glucoza liberă din sânge (vezi fig.).

Fiecare etapă este catalitică ceea ce conduce la o amplificare semnificativă a semnalului iniţial şi anume legarea unui număr relativ mic de molecule de adrenalină pe suprafaţa celulelor hepatice. Activitatea maximă se atinge în câteva secunde.

Adrenalina stimulează scindarea glicogenului, dar şi inhibă sinteza acestuia în ficat, deoarece formarea de AMP ciclic stimulează fosforilarea de către protein kinază a *glicogen sintetazei,* cu producerea formei sale inactive.

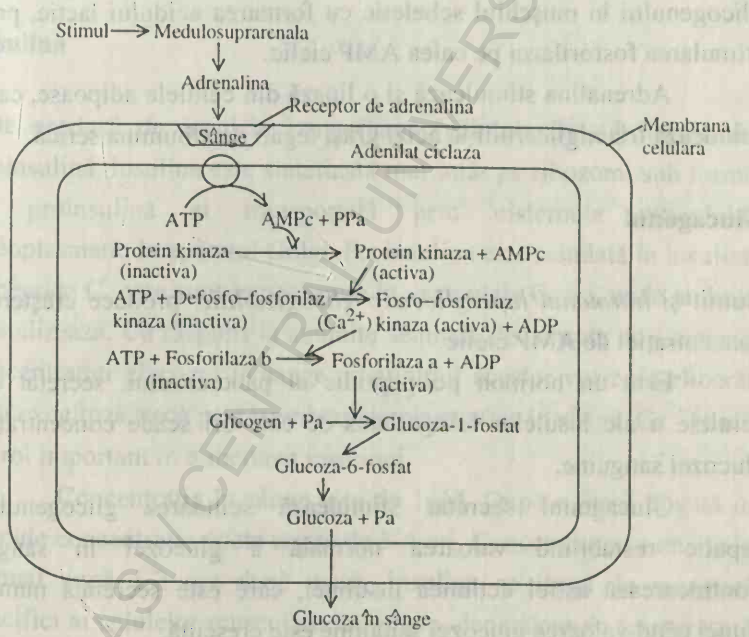


Fig. 7.3. Cascada de amplificare in stimularea glicogenolizei de catre adrenalina in celula hepatica, cu formarea glucozei sanguine.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR BIBLIOTECA

Şase resturi de serină din molecula glicogen sintetazei sunt fosforilate pe seama ATP.

Oprirea secreţiei adrenalinei conduce la sistarea sintezei de AMP ciclic, iar cel rămas este distrus de fosfodiesterază. Subunităţile protein kinazei se reasociază într-un complex fără activitate catalitică. Forma fosforilată a fosforilaz kinazei suferă o defosforilare, ca şi fosforilaza *a* însăşi, prin acţiunea fosforilaz fosfatazei. În acest fel, sistemul glicogenolitic este readus la starea normală de repaos.

Adrenalina influenţează, de asemenea, scindarea glicogenului în muşchiul scheletic cu formarea acidului lactic, prin stimularea fosforilazei pe calea AMP ciclic.

Adrenalina stimulează şi o lipază din celulele adipoase, care scindează triacilglicerolii la acizi graşi legaţi de albumina serică.

Glucagonul

Numit şi *hormonul hiperglicemic–glicogenolitic*, produce creşterea concentraţiei de AMP ciclic.

Este un hormon polipeptidic al pancreasului, secretat de celulele α ale insulelor Langerhans de câte ori scade concentraţia glucozei sanguine.

Glucagonul secretat stimulează scindarea glicogenului hepatic restabilind valoarea normală a glucozei în sânge. Contracarează astfel acţiunea insulinei, care este secretată numai atunci când valoarea glucozei sanguine este crescută.

Glucagonul este un polipeptid cu 29 resturi de aminoacizi. Acesta este sintetizat ca precursor inactiv cu o masă moleculară mai

mare, *proglucagon,* care conține aminoacizi suplimentari la capătul C–terminal al glucagonului.

Glucagonul acționează preponderent la nivelul ficatului fără a afecta scindarea glicogenului muscular, în timp ce adrenalina stimulează scindarea glicogenului în ambele țesuturi.

Ca și adrenalina, glucagonul își exercită acțiunea prin legarea sa de receptori specifici de pe membrana celulelor hepatice, stimulând *adenilat–ciclaza.* Creșterea în consecință a AMP ciclic produce creșterea concentrației fosforilazei *a* în ficat, prin aceeași secvență de reacții de amplificare ca și în cazul adrenalinei.

Insulina

Este produsă de insulele Langerhans (celulele β) sub formă de proinsulină. Insulina este sintetizată mai întâi pe ribozomi sub formă de proinsulină și transportată prin cisternele reticulului endoplasmatic la aparatul Golgi. Proinsulina este scindată în insulină și peptida C, care sunt împachetate în veziculele Golgi, unde ambele cristalizează. Ca răspuns la anumite semnale declanșate de creșterea concentrației glucozei în sânge, conținutul acestor vezicule eliberat prin exocitoză trece prin membranele plasmatice în sânge. Ca^{2+} joacă un rol important în eliberarea insulinei.

Concentrația în sânge este de 1nM. După o masă bogată în glucide concentrația poate crește de 3-4 ori. Concentrația sa revine la normal după 1-2 ore după masă. Insulina se leagă de receptori specifici ai celulelor musculare sau grase, dependent de temperatură și timp.

Legarea este însoțită de efecte metabolice caracteristice asupra celulelor grase, în special creșterea sintezei triacilgliceroliilor din glucoză și scăderea hidrolizei enzimatice a lipidelor. Insulina se leagă de o proteină receptoare cu M ≈ 300.000, cu mare afinitate pentru insulină.

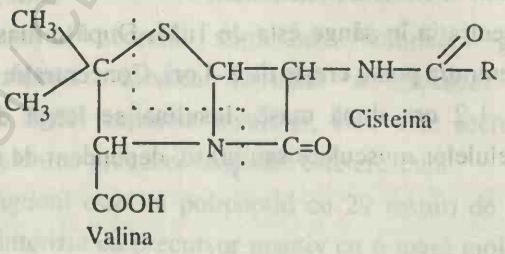
Legarea sa nu produce AMP ciclic, ci chiar o scădere a acestuia. Se pare că acționează asupra GMP ciclic, ce este în interdependență reciprocă cu AMP ciclic.

Insulina este în relație de interdependență cu alți patru hormoni:

1. glucagonul
2. hormonul de creștere hipofizar
3. hormonii glucocorticoizi
4. adrenalina (epinefrina)

Peptide cu acțiune antibacteriană

Penicilinele sunt polipeptide atipice care conțin acid 6–amino–penicilanic, pe molecula căruia sunt grefați diverși radicali. În structura penicilinelor se pot recunoaște valina și cisteina care au gruparea aminică acilată. Dacă R = C_6H_5–CH_2,compusul se numește benzil–penicilină sau penicilina G, cea mai răspândită.



Tirocidinele (A, B) sunt decapeptide care diferă între ele prin natura unor aminoacizi: tirocidina A conține D–fenilalanină.

Val– Orn–Leu–DPhe–Pro
| |
Tyr–Glu–Asn–DPhe–Phe

Bradikinina și kalidina (Lizil–bradikinină) sunt agenți hipotensivi eliberați din proteinele plasmatice specifice prin tratamentul acestora cu venin de șarpe sau tripsină.

Arg–Pro–Pro–Gly–Phe–Ser–Pro–Phe–Arg
Bradikinina

Lys–Arg–Pro–Pro–Gly–Phe–Ser–Pro–Phe–Arg
Kalidina

Gramicidinele sunt polipeptide care se deosebesc prin cantitatea de triptofan și tirozină pe care o conțin. Gramicidina S conține difenilalanină și este primul polipeptid ciclic cu activitate antibacteriană preparat sintetic.

Val– Orn–Leu–DPhe–Pro
| |
Pro–DPhe–Leu–Orn–Val

Gramicidina

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAP. VIII. METABOLISMUL PROTEINELOR

Sinteza proteinelor necesită o sursă de energie metabolică (ATP) şi aminoacizi care sunt precursorii intermediari ai proteinelor.

Proteinele sunt mai întâi sintetizate în structurile intracelulare conţinute în microzomi, după care sunt transferate către alte componente celulare. Încorporarea aminoacizilor în proteine la nivelul fracţiei microzomale necesită ATP. Nu este necesară întreaga celulă atunci când se studiază biosinteza proteinelor *in vitro*, ci numai fragmente de microzomi.

Sinteza lanţului polipeptidic are loc în patru etape principale:

1. *Activarea* se desfăşoară în citoplasma solubilă unde aminoacizii sunt esterificaţi enzimatic cu ARN_t corespunzător, pe seama energiei furnizate de ATP.

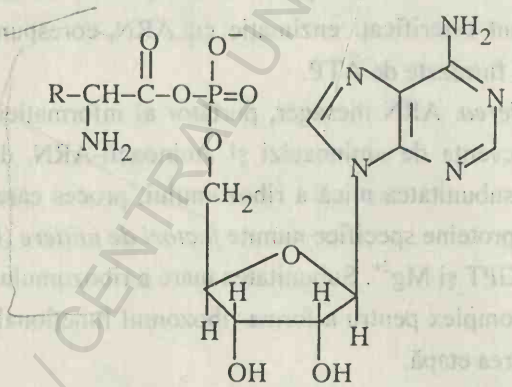
2. *Iniţierea.* ARN mesager, purtător al informaţiei genetice specificând secvenţa de aminoacizi şi aminoacil-ARN_t de iniţiere sunt legaţi de subunitatea mică a ribozomului, proces care necesită prezenţa a trei proteine specifice numite *factori de iniţiere* (FI-1, FI-2 şi FI-3), cât şi GPT şi Mg^{2+}. Subunitatea mare a ribozomului se leagă apoi de acest complex pentru a forma ribozomul funcţional, pregătit pentru următoarea etapă.

3. *Elongarea* sau *alungirea* presupune adăugarea secvenţială de noi resturi de aminoacil transferaţi enzimatic de pe esterii aminoacil-ARN_t, fiecare dintre ei fiind legaţi de ribozom ca răspuns la un codon specific sau triplet de baze din molecula ARN_m. Sunt necesari *factorii de elongare*, FE-T şi FE-G, de natură proteică.

După formarea fiecărei noi legături peptidice, ribozomul alunecă de-a lungul ARN_m pentru a aduce următorul codon în dreptul aminoacil-ARN_t, proces care necesită energie sub formă de GTP.

4. *Terminarea.* Lanțul polipeptidic este complet când se ating semnalele corespunzătoare de pe ARN_m; produsul este apoi desprins de pe ribozom, proces care necesită prezența unor proteine specifice numite *factori de desprindere.*

Sinteza proteinelor începe de la capătul C-terminal și se continuă spre capătul N-terminal. La 37°C, un singur ribozom poate sintetiza un întreg lanț α de hemoglobină (146 resturi de aminoacid) în aproximativ 3 minute, adică în mai puțin de o secundă pentru un rest de aminoacid încorporat. În *E. coli* și în alte bacterii, crescând în condiții optime, un ribozom funcțional poate însera în lanț aproximativ 20 aminoacizi pe secundă.



Reacția de activare

Cei douăzeci de aminoacizi din citosol sunt esterificați cu ARN_t sub acțiunea unei clase de enzime, numite aminoacil-ARN_t sintetaze.

fiecare dintre ele fiind înalt specifică pentru un anumit aminoacid şi pentru ARN_t-ul său corespunzător.

$$\text{Aminoacid} + ARN_t + ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil} - ARN_t + AMP + PPa$$

Enzimele de activare, obţinute în stare purificată, cristalizate, au M = 100.000 – 240.000. Unele au numai un singur lanţ polipeptidic cu M = 100.000 (leucina), altele 2 sau mai multe unităţi diferite sau identice. Glicil-ARN_t sintetaza are două subunităţi cu M = 35.000 şi alte două cu M = 80.000. Toate aceste enzime au nevoie absolută de Mg^{2+} şi toate conţin unul sau mai multe grupe SH care sunt esenţiale pentru activitatea lor enzimatică.

Transferul unui aminoacid pe ARN_t respectiv se realizează în două etape distincte. În prima etapă, ATP reacţionează cu aminoacidul formându-se un intermediar legat de enzimă, *aminoacil–acid adenilic*. La acest intermediar, grupa COOH a aminoacidului este legată, printr-o legătură macroergică de grupa 5'–fosfat din AMP.

În a doua etapă, grupa acil este transferată de pe AMP la capătul 3' al ARN_t corespunzător aminoacidului, urmată de eliberarea produşilor, un aminoacil-ARN_t şi acidul adenilic:

$$\text{Aminoacid} + ATP \rightleftharpoons [\text{aminoacil} - \text{acid adenilic}] + PPa$$

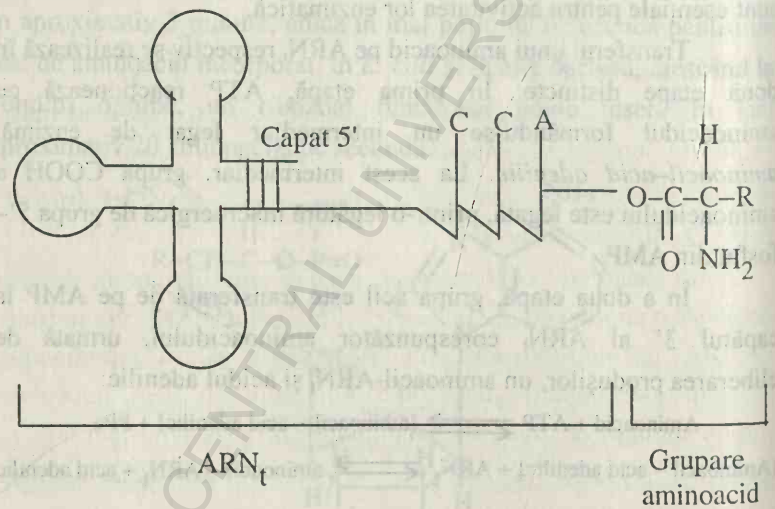
$$[\text{Aminoacil} - \text{acid adenilic}] + ARN_t \rightleftharpoons \text{aminoacil} - ARN_t + \text{acid adenilic}$$

Aminoacil – ARN_t sintetazele sunt înalt specifice atât faţă de aminoacid, cât şi faţă de ARN_t corespunzător. Ele au o mare capacitate de a deosebi diferiţi aminoacizi naturali între ei, încât şansa unei erori este de 1/10.000. Există totuşi analogi abiogeni ai unor aminoacizi, cum ar fi *p-fluorfenilalanina,* un analog al

fenilalaninei, precum şi *etionina* şi *norleucina,* analogi ai metioninei. Când aceşti analogi sunt administraţi prin hrana animalelor, ei sunt încorporaţi în proteine în poziţiile ocupate în mod normal de fenilalanină, respectiv metionină.

Moleculele de ARN_t posedă 73-93 de resturi nucleotidice şi M ~ 25.000 şi o conformaţie spaţială specifică (un trifoi cu patru foi). Unii ARN_t, cu catene mai lungi,pot forma şi al cincilea braţ, mai scurt.

Toate moleculele de ARN_t au aceeaşi secvenţă terminală Pu–C–C–A la capătul 3' al braţului pentru aminoacid.



În capătul opus se află *anticodonul* (pe braţul anticodon), care este complementar codonului corespunzător din molecula de ARN_m.

Tripletul anticodon al aminoacil–ARN_t are o secvenţă de baze care permite formarea de legături de hidrogen specifice cu bazele codonului corespunzător de pe ARN_m. În acest fel,

aminoacidul necesar este selectat şi corect poziţionat pentru a fi transferat pe lanţul polipeptidic în creştere.

Molecula de ARN_t mai conţine *locul de recunoaştere al enzimei,* prin care ARN_t se leagă de enzima de activare corespunzătoare, şi *locul de ataşare de ribozom.*

În molecula de ARN_t sunt prezente unele baze rare, pe lângă bazele normale A, U, G şi C. Ele sunt în general derivaţi metilaţi ai bazelor normale. Acestea au următoarele funcţii:

a) să împiedice formarea de legături, în anumite puncte, între bazele aceleiaşi molecule de ARN_t în aşa fel încât să rezulte structura caracteristică braţului;

b) să nu permită formarea de legături între bazele perechi din ARN_t şi ARN_m;

c) să reducă susceptibilitatea ARN_t la atacul hidrolitic al nucleazelor.

Pentru fiecare aminoacid există mai mult de un ARN_t specific. La sinteza proteică mitocondrială şi la cea citoplasmatică se utilizează tipuri diferite de ARN_t. Sintetazele corespunzătoare sunt şi ele specifice pentru ARN_t mitocondrial sau citoplasmatic.

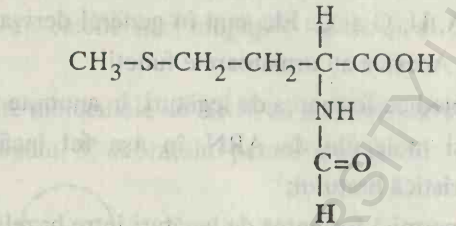
Rolul de adaptor al ARN_t

După esterificare cu ARN_t corespunzător, aminoacidul nu mai contribuie la specificitatea aminoacil–ARN_t, deoarece grupa aminoacil ca atare nu este recunoscută nici de ribozom şi nici de matriţa de ARN_m.

Inițierea lanțului polipeptidic

Sinteza tuturor proteinelor începe cu aminoacidul metionină, codificat de codonul de inițiere AUG.

Metionina de inițiere nu intră ca metionil–ARN_t, ci ca N–formilmetionil–ARN_t (fMet–ARN_t).



Formilarea se realizează cu N^{10}–formiltetrahidrofolat la gruparea α–amino a metionil–ARN_t.

Enzima care catalizează această reacție nu formilează metionina liberă.

N^{10}–Formiltetrahidrofolat + Met - ARN_t ⟶ Tetrahidrofolat + fMet - ARN_t

În timpul sintezei proteice are loc o continuă disociere a ribozomilor 70S în subunitățile 50S și 30S și o continuă reasociere a subunităților pentru a forma din nou ribozomii intacți. ARN_m și aminoacil–ARN_t de inițiere nu se pot lega direct de ribozomul 70S, ci sunt mai întâi legați de subunitatea 30S care se combină apoi cu subunitatea 50S.

La acest proces participă trei proteine specifice, numite factori de inițiere (FI-1, FI-2 și FI-3). Sunt proteine extrase de pe ribozomi, sub formă solubilă, cu M = 9.000; 65.000 și, respectiv, 21.000. Acești factori se atașează și se desprind continuu de pe ribozom.

Subunitatea 30S formează un complex cu FI-3, care se leagă apoi de ARN_m. La acest complex se adaugă o moleculă de FI-1.

După aceasta, fMet–ARN$_t$ şi GPT se leagă de FI-2, iar complexul rezultat se combină cu complexul format de subunitatea 30S, FI-3, ARN$_m$ şi FI-1. Rezultă astfel *complexul de iniţiere.*

Complexul de iniţiere se combină apoi cu subunitatea 50S pentru a forma ribozomul 70S complet, funcţional.

Ciclul de elongaţie

Acest proces decurge în trei etape:

1. *Legarea noului aminoacil–ARN$_t$.* Acesta este aşezat pe situsul aminoacil (situs A) al complexului ribozomal 70S. La început se leagă de o proteină citoplasmatică specifică, numită, la procariote, *factor de elongaţie T* (FE–T). FE–T conţine două subunităţi: FE–T$_s$ şi FE–T$_u$. FE–T se combină cu GTP pentru a forma complexul FE–T$_u$–GTP, eliberându-se în acelaşi timp FE–T$_s$. Complexul FE–T$_u$–GTP se leagă apoi de aminoacil–ARN$_t$ pentru a forma complexul ternar FE–T$_u$–GTP–aminoacil–ARN$_t$. Acest complex se leagă de ribozom astfel încât aminoacil–ARN$_t$ să fie aşezat pe situsul A, cu anticodonul său legat prin legături de hidrogen de codonul corespunzător din ARN$_m$. Concomitent GTP este hidrolizat la GDP şi Pa. GDP părăseşte ribozomul sub formă de complex FE–T$_u$–GDP. Energia eliberată la hidroliza GTP serveşte la poziţionarea corectă a aminoacil–ARN$_t$ pe situsul A, deoarece FE–T nu acceptă fMet–ARN$_t$ de iniţiere.

Legarea aminoacil–ARN$_t$ de situsul A poate fi blocată de unele antibiotice, în special de tetracicline. La celulele eucariote, factorii de elongare se numesc FE-1 şi FE-2 şi funcţionează diferit.

2. *Formarea legăturii peptidice*

Prima legătură peptidică se formează printr-un atac nucleofil al grupei NH_2 a aminoacil–ARN$_t$ asupra carbonului carboxilic

esterificat al fMet–ARN_t. Reacția este catalizată de *peptidil transferază,* prezentă pe subunitatea 50S a ribozomului. Rezultă un dipeptidil–ARN_t legat de situsul A.

Un proces identic are loc la fiecare ciclu de elongație. Gruparea NH_2 liberă a noului aminoacil–ARN_t legat de situsul A deplasează ARN_t din peptidil–ARN_t pentru a forma o nouă legătură peptidică.

3. *Translocația* are loc după formarea legăturii peptidice.

Ribozomul se deplasează la următorul codon de pe ARN_m și mută, în același timp, peptidil–ARN_t de pe situsul A pe situsul P. Pentru aceasta sunt necesare o proteină specifică, numită *factor de elongație G* (FE–G), cât și GPT.

La început GTP se leagă de FE–G și complexul rezultat se leagă de ribozom. GTP este apoi hidrolizat la GDP și Pa. Această hidroliză pune la dispoziție energia necesară pentru realizarea unei modificări conformaționale care deplasează ribozomul la următorul codon de pe ARN_m și trece peptidil–ARN_t de pe situsul A pe situsul P.

Situsul A devine liber, cu un nou codon în poziție, pregătit să primească un nou aminoacil–ARN_t, declanșându-se astfel un nou ciclu de elongație. După translocație, FE–G se disociază de pe ribozom. Pare ca și cum ARN_m ar aluneca printr-un șanț, deoarece o parte apreciabilă a lanțului de ARN_m nu este atacată de ribonuclează.

Terminarea lanțului polipeptidic

Terminarea sintezei lanțului polipeptidic este semnalată de unul din cei trei codoni de stop de pe ARN_m.

Desprinderea polipeptidil–ARN_t de pe ribozom este inițiată de trei proteine specifice, numite factori de desprindere, notați cu R_1,

R_2 şi R_3. Aceştia se leagă de ribozom pentru a permite trecerea polipeptidil–ARN_t de pe situsul A pe situsul P.

Legătura esterică dintre lanţul polipeptidic şi ultimul ARN_t este apoi hidrolizată, prin acţiunea unei *peptidiltransferaze*, a cărei acţiune catalitică şi specificitate pare să fie modificată de factorii de desprindere legaţi de ribozom. Odată ce polipeptidul este desprins, sunt eliberaţi şi ultimul ARN_t şi ARN_m. Ribozomul liber 70S se disociază în subunităţile sale 50S şi 30S, proces care necesită prezenţa unuia dintre factorii specifici de iniţiere şi sinteza unui nou lanţ polipeptidic poate începe.

Prelucrarea post-translaţională

Grupa N-formil a restului de metionină (fMet) nu apare în proteina finită a procariotelor; ea este îndepărtată prin acţiunea unei deformilaze.

Restul metionil de iniţiere al unor polipeptide poate fi îndepărtat de către o metionin–amino–peptidază.

Unele proteine sunt acetilate la grupa α–amino–terminală.

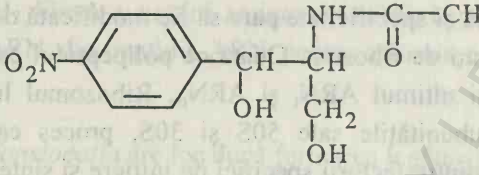
Legăturile disulfurice încrucişate dintre lanţuri se formează pe cale enzimatică după ce lanţul polipeptidic a fost deja construit.

Alte modificări covalente care au loc după translaţie include reacţiile de fosforilare, metilare, hidroxilare, cât şi reacţiile de prindere a grupelor prostetice.

Inhibitori ai sintezei proteice

Cloramfenicolul inhibă sinteza proteică pe ribozomul 70S al celulelor procariote (şi al mitocondriilor celulelor eucariote) prin blocarea transferului de peptidil–ARN_t, dar nu inhibă sinteza proteică

pe ribozomul 80S al celulelor eucariote. Cloramfenicolul a fost utilizat în tratamentul unor infecții în patologia umană, însă este relativ toxic, deoarece este posibil ca el să inhibe și sinteza proteică în ribozomii mitocondriali.



Streptomicina și antibioticele înrudite (neomicina, canamicina) se leagă de subunitatea mică a ribozomilor celulelor procariote. Ele inhibă sinteza proteică și produc citirea greșită a codului genetic, probabil prin modificarea conformației ribozomului astfel încât aminoacil–ARN-urile de transfer sunt mai puțin strâns legate de ARN_m.

Alcaloidul *emetină,* inhibă legarea aminoacil–ARN_t, iar *toxina difterică,* o enzimă produsă de către bacteria difterică, catalizează reacția dintre NAD^+ și factorul de elongație FE–2 în ribozomii celulelor eucariote, pentru a rezulta un complex inactiv ADP–riboză–FE–2, ceea ce conduce la blocarea translocației.

Abrina și ricina sunt proteine vegetale toxice care inhibă sinteza proteică în ribozomii eucariotelor, prin blocarea elongației.

Necesarul energetic al sintezei proteice

Un număr total de 4 grupe fosfat macroergice sunt necesare pentru sinteza fiecărei legături peptidice din lanțul polipeptidic complet. Astfel, 2 legături fosfat macroergice sunt utilizate pentru formarea fiecărei molecule de aminoacid–ARN_t în timpul reacției de activare a aminoacidului. O moleculă de GTP este scindată în GDP și Pa în

timpul legării fiecărui aminoacil–ARN_t de situsul A de pe ribozom, iar o altă moleculă de GTP este hidrolizată în timpul translocării ribozomului de-a lungul ARN_m.

Sunt astfel investite 7,3 · 4 = 29,2 kcal pentru a se obține o legătură peptidică a cărei energie liberă este de aproximativ –5,0 kcal. Deci, ΔG° a sintezei legăturii peptidice este de –24,2 kcal, făcând astfel sinteza acestei legături un proces exergonic și ireversibil.

Sinteza proteică, la cele mai multe organisme, consumă mai multă energie decât oricare alt proces biosintetic; în celulele de *E. coli*, până la 90% din energia celulară este utilizată pentru sinteza proteică.

Digestia și absorbția proteinelor

Digestia proteinelor alimentare este realizată de către proteinaze sau enzime proteolitice, localizate la nivelul tractului gastro-intestinal și începe în stomac. Aici, sub acțiunea pepsinei rezultată din pepsinogen, la pH 1,5 – 2,5, proteinele alimentare sunt degradate cu formare de proteoze și peptone, cu mase moleculare mici, solubile în apă.

Chimul alimentar, produs semilichid de alimente parțial digerate, trece apoi în duoden unde, datorită acidității sale, determină secreția de către *mucoasa duodenală* a unui hormon, *secretina*. Concomitent, este secretat un alt hormon, pancreozimina, sub influența proteozelor și aminoacizilor liberi din chimul alimentar. Acești hormoni stimulează de asemenea secreția pancreasului: secretina determină eliberarea apei și sărurilor minerale, iar pancreozimina secreția enzimelor pancreatice.

Sucul pancreatic conține sub formă de *precursori inactivi*, denumiți *zimogenproenzime, tripsinogen*, chimotripsinogen, procarboxipeptidază și proelastază. Acești precursori trec în formă activă sub acțiunea *enterokinazei* sau a *tripsinei*.

Tripsina și chimotripsina degradează hidrolitic proteozele și peptonele cu formare de peptide, alcătuite din 6 – 9 aminoacizi, dipeptide, și într-o măsură mică, din aminoacizi liberi. Carboxipeptidaza hidrolizează legătura peptidică dintr-o moleculă de peptidă care se găsește în vecinătatea unei grupe carboxil libere, dând naștere la aminoacizi liberi.

În intestinul subțire, produșii de hidroliză rezultați sub acțiunea sucului pancreatic sunt degradați în continuare de către sucul intestinal. Acesta conține aminopeptidaze, dipeptidaze și polipeptidaze. Rezultatul final al digestiei la nivelul intestinului sunt dipeptidele și aminoacizii liberi.

Proteinele sunt absorbite la nivelul intestinului subțire sub formă de aminoacizi liberi, rezultați în urma degradării enzimatice a macromoleculelor proteice. Transportul aminoacizilor în celulele mucoasei intestinale este un proces activ, diferit ca mecanism pentru diverse grupe de aminoacizi.

După absorbție, aminoacizii sunt transportați de curentul sanguin către țesuturi. Aici, sunt metabolizați sau utilizați pentru biosinteza proteinelor.

BCU IAȘI / CENTRUL DE VIZITARE

Cap. IX. FOTOSINTEZA

Atât procariotele cât şi eucariotele sunt capabile să realizeze fotosinteza. Nu numai plantele verzi superioare, ci şi algele verzi, brune sau roşii multicelulare, precum şi organismele unicelulare cum ar fi euglenoidele sunt fotosintetizante. Dintre procariote, algele verzi-albastre, bacteriile verzi şi cele purpurii realizează fotosinteza. Mai mult de jumătate din reacţiile fotosintetice se petrec în organismele unicelulare, în special în alge.

Ecuaţia fotosintezei

În afara bacteriilor, organismele fotosintetizante utilizează apa ca donor de electroni, respectiv de hidrogen şi CO_2 sau alt acceptor de electroni care se reduce. Ca urmare se produce O_2 molecular. Reacţia globală ar fi:

$$nH_2O + nCO_2 \xrightarrow{h\nu} (CH_2O)_n + nO_2$$

unde, cel mai adesea, n = 6, produsul fotosintezei fiind o hexoză.

Bacteriile fotosintetizante nu produc şi nu consumă O_2. De regulă, cele mai multe dintre acestea sunt strict anaerobe, pentru care O_2 este toxic. În locul apei folosesc însă ca donori de electroni compuşi anorganici de tipul H_2S sau organici, cum ar fi acidul lactic şi izopropanolul. Astfel, bacteriile sulfuroase verzi folosesc H_2S conform ecuaţiei:

$$2H_2S + CO_2 \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + S$$

Principial, procesul fotosintetic este asemănător la plante şi la bacterii, în ciuda deosebirii în ceea ce priveşte donorul de electroni. Aceeaşi asemănare devine evidentă dacă reformulăm ecuaţia fotosintezei:

$$2H_2D + CO_2 \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + 2D$$

în care H_2D este donorul de hidrogen, iar D este forma sa oxidată. $H_2D = H_2O$; H_2S; izopropanol etc.

Cu H_2O având oxigenul marcat, s-a demonstrat că oxigenul eliberat provine din apă.

$$2H_2O + CO_2 \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + O_2$$

Reacţii la lumină şi la întuneric

Fotosinteza în plantele verzi se petrece în 2 etape: la lumină, dependentă de energia luminoasă şi la întuneric.

În prima fază, energia luminoasă este absorbită de către clorofilă. În această fază se produce O_2 şi două produse bogate în energie: ATP şi reducătorul NADPH.

În faza de întuneric, moleculele de ATP şi NADPH sunt utilizate pentru obţinerea glucozei şi a altor produşi organici. Formarea O_2 şi reducerea CO_2 sunt deci două procese diferite şi bine delimitate.

Vom descrie, în principiu, fotosinteza la plantele verzi superioare.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Sistemul fotosintetic intracelular

Aparatul fotosintetizator din plantele verzi superioare este localizat în cloroplaste. Acestea sunt de obicei mult mai mari decât mitocondriile (1-10 μm diametru). Au formă sferică sau lenticulară şi sunt înconjurate de o membrană simplă, continuă şi fragilă la partea exterioară. Membrana interioară formează vezicule care sunt stivuite în cloroplaste. Aceste stive se numesc *grana*. *Grana* conţin pigmenţii cloroplastelor şi enzimele pentru reacţiile primare dependente de lumină. Cloroplastele pot fi separate din celulele vegetale prin centrifugare diferenţială.

Obţinerea moleculelor în stare excitată

Lumina albă conţine radiaţiile electromagnetice cu lungimea de undă λ cuprinsă între 400 şi 700 nm. Ea provine din soare din reacţia de fuziune a hidrogenului cu formarea heliului.

$$4\ {}^{1}_{1}H \longrightarrow {}^{4}He + 2e^{-} + h\nu$$

$h\nu$ se numeşte cuantă, fiind cea mai mică particolă de energie luminoasă; h este constanta lui Plank ($h = 6{,}6262 \times 10^{-34}$ Js) şi ν = frecvenţa radiaţiei.

1 Echivalent de substanţă corespunde la $E = L \cdot h \cdot \nu = 1$ einstein (L = N = nr. Avogadro = $6{,}023 \cdot 10^{23}$ mol^{-1}).

Capacitatea unei substanţe de a absorbi lumina depinde de structura sa atomică, în special de aranjarea electronilor în jurul nucleului. Electronii care primesc energie luminoasă trec într-o stare excitată, fiind promovaţi pe un nivel energetic superior. Sunt

absorbiți numai fotonii cu o anumită lungime de undă. Absorbția se face pe principiul "totul sau nimic", de unde și denumirea de cuantă pentru energia fotonică.

Particolele în stare excitată sunt de regulă instabile. Dacă iluminarea încetează, electronii cad pe nivelele energetice pe care le-au avut anterior, cu alte cuvinte revin în starea fundamentală. Revenirea se face cu eliberarea energiei de excitare sub formă de căldură sau lumină. În anumite cazuri se observă și fluorescență.

Pigmenții implicați în fotosinteză

Celulele plantelor fotosintetizante conțin unul sau mai multe tipuri de coloranți verzi numiți clorofile. Algele și bacteriile fotosintetizante conțin însă coloranți purpurii, roșii sau bruni. În celulele fotosintetizantelor se mai pot găsi și alte clase de coloranți capabili să absoarbă lumina. Dintre acești pigmenți auxiliari pot fi amintite carotii xidele galbene și ficobilinele roșii sau albastre.

Clorofila

Se cunosc două tipuri de clorofilă: *clorofila a* pe de o parte și *clorofilele b, c, d* pe de altă parte. Clorofila a se găsește în toate celulele plantelor superioare. Cel de-al doilea tip de clorofilă, clorofila b,c sau d se află, alături de clorofila a, numai în celulele capabile să elibereze oxigen. Astfel, clorofila b se găsește în plantele verzi, clorofila c în algele brune, diatomee și dinoflagelate, clorofila d în algele roșii. Celulele care nu produc oxigen, nu posedă cel de-al doilea tip de clorofilă.

Molecula de clorofilă conține 4 inele pirolice substituite, ordonate într-o structură macrociclică, în care cei 4 atomi de azot leagă un atom de magneziu la mijlocul lor. Este un complex planar extrem de stabil. Molecula mai posedă o catenă laterală terpenoidă, hidrofobă, ce constă dintr-un rest alcoolic numit fitol esterificat cu restul de acid propionic de la inelul IV (fig. 8.1).

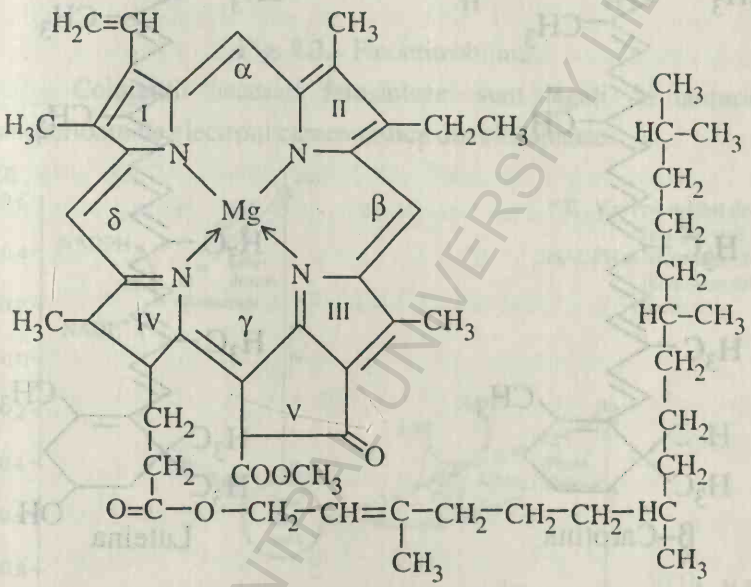


Fig. 8.1. Clorofila a

Dacă se reprezintă grafic cantitatea de oxigen produsă în fotosinteză în funcție de lungimea de undă a luminii folosite se obține spectrul fotochimic de acțiune. Acesta este un grafic ce indică o proporționalitate între cantitatea de energie absorbită la diversele lungimi de undă și cantitatea de oxigen produsă.

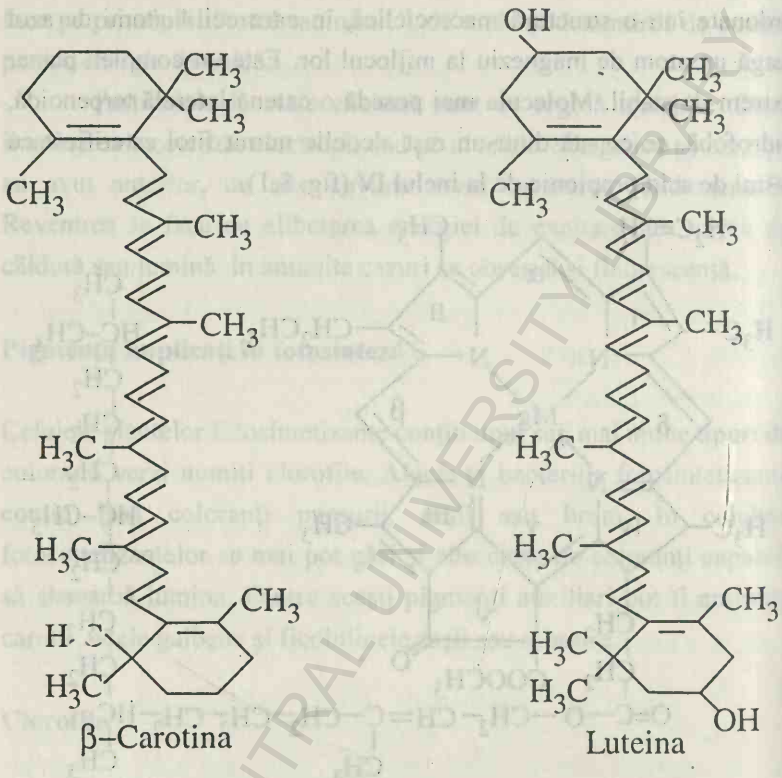


Fig. 8.2. Pigmenti carotenoidici

Aceştia sunt receptori ai luminii în domeniul spectral neacoperit de clorofile. Dintre carotinoide, importante pentru fotosinteză sunt β-carotina şi luteina (fig.8.2).

Coloranții ficobilinici se găsesc în algele roşii şi în cele verzi-albastre şi, spre deosebire de clorofilă, au o moleculă formată dintr-un lanț tetrapirolic (fig.8.3).

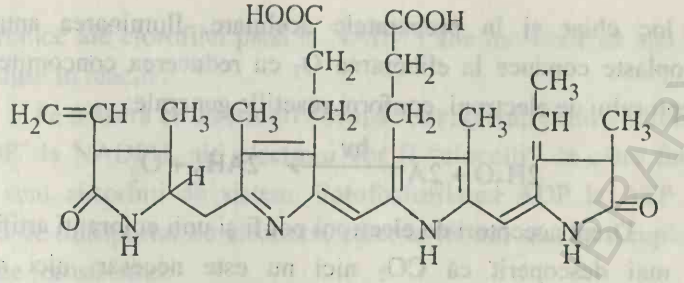


Fig. 8.3. Ficoeritrobilina

Coloranții necesari fotosintezei sunt legați de lanțurile transportoare de electroni caracteristice din cloroplaste.

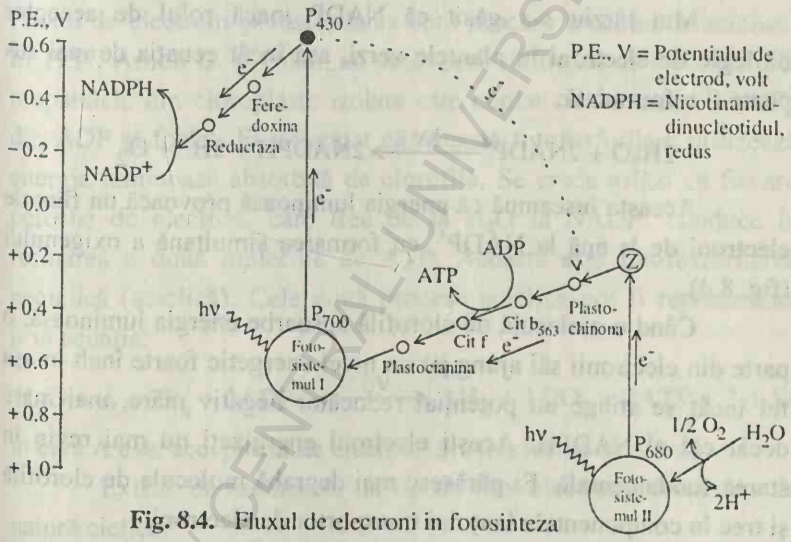


Fig. 8.4. Fluxul de electroni in fotosinteza

Reacția Hill și transportul de electroni fotoindus

În 1937, R. Hill a făcut legătura dintre absorbția luminii și fluxul de electroni. Acesta a găsit că formarea oxigenului sub influența luminii

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

are loc chiar şi în preparatele acelulare. Iluminarea anumitor cloroplaste conduce la eliberarea O_2 cu reducerea concomitentă a receptorului de electroni, conform reacţiile generale:

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{h\nu} 2AH_2 + O_2$$

Drept acceptori de electroni pot fi şi unii coloranţi artificiali. S-a mai descoperit că CO_2 nici nu este necesar, nici nu se acumulează într-o formă stabilă, în această fază. Reducerea CO_2 şi formarea O_2 sunt independente. Ecuaţia de mai sus se mai numeşte şi reacţia Hill, iar acceptorul A sintetic, reactiv Hill.

Mai târziu s-a găsit că NADP joacă rolul de acceptor biologic de electroni în plantele verzi, aşa încât ecuaţia de mai sus poate fi reformulată:

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{h\nu} 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Aceasta înseamnă că energia luminoasă provoacă un flux de electroni de la apă la $NADP^+$, cu formarea simultană a oxigenului (fig. 8.4).

Când o moleculă de clorofilă absoarbe energia luminoasă, o parte din electronii săi ajung pe un nivel energetic foarte înalt în aşa fel încât se atinge un potenţial reducător negativ mare, mai mare decât cel al NADPH. Aceşti electroni energizaţi nu mai revin în starea fundamentală. Ei părăsesc mai degrabă molecula de clorofilă şi trec în componentele lanţului transportor de electroni.

Acest lanţ serveşte la dirijarea electronilor bogaţi în energie de la clorofilă spre $NADP^+$ care este astfel redus la NADPH. Acest flux de electroni de la clorofilă la acceptor se numeşte transportul electronic al fotosintezei. Reducerea acceptorului se numeşte şi fotoreducere.

Pe măsură ce electronii apei sunt trimişi prin "golurile"

electronice ale clorofilei până la $NADP^+$, alte molecule de apă sunt introduse în reacție.

Pe măsură ce electronii din apă sunt activați pentru reducerea $NADP^+$ la NADPH, alți electroni vor fi "ciocniți" de către fotonii care sunt absorbiți de sistem. Fotofosforilarea ADP la ATP este legată de transportul de electroni, care, la rândul său, este cuplat cu ambele fotosisteme.

Fluxul electronic și fosforilarea

Fluxul de electroni și fosforilarea sunt procese biochimice aciclice. În 1957, Arnon D. și colab. au descoperit că fluxul de electroni din preparatele din cloroplaste izolate este cuplat cu formarea de ATP din ADP și fosfat. Ei au arătat că această fotofosforilare utilizează energia luminoasă absorbită de clorofilă. Se crede astăzi că fiecare pereche de electroni care trec de la H_2O la $NADP^+$ conduce la formarea a două molecule de ATP. Aceasta este fotofosforilarea neciclică (aciclică). Cele două procese aciclice pot fi reprezentate prin ecuația:

$$H_2O + A + 2P_a + 2ADP \xrightarrow{h\nu} AH_2 + 1/2O_2 + 2ATP + 2H_2O$$

în care A este acceptorul de electroni și AH_2 forma sa redusă.

Există, de asemenea, un tip de flux electronic fotoindus de natură ciclică.

Fotoreacții în fotosinteză

Cloroplastele conțin două tipuri de clorofilă. În fotosinteza realizată de unele bacterii participă numai un tip de clorofilă, însă nu se eliberează oxigen. Plantele verzi au o mai mare eficiență fotosintetică

deoarece utilizează diferite lungimi de undă, între 600 şi 700 nm. S-a constatat că plantele verzi posedă două fotosisteme. Fotosistemul I este activat de lumina cu lungimea de undă de 700 nm face parte dintr-un centru de reacţie ce conţine mai multă clorofilă a decât b şi care nu dezvoltă O_2. Fotosistemul II este activat de lungimi de undă mai mici este responsabil de producerea O_2. El utilizează clorofila b,c,d şi pigmenţii auxiliari. Celulele producătoare de O_2 posedă ambele sisteme, în timp ce bacteriile ce nu pot elibera O_2 au numai fotosistemul I.

Legătura dintre cele două fotosisteme

Cele două fotosisteme (I şi II) sunt legate între ele (fig.8.5). Fotosistemul I oferă electronii săi în stare excitată care, prin intermediul unui lanţ de purtători de electroni, ajung la $NADP^+$ care va fi redus. Fotosistemul I va fi astfel golit de electroni şi trebuie reîncărcat. Aceşti electroni pot fi luaţi de la apă prin intermediul fotosistemului II şi lanţului transportor de electroni.

La iluminarea fotosistemului II unii dintre electronii săi vor fi ridicaţi pe un nivel bogat în energie şi vor "zbura" prin lanţul de transportori de electroni până la fotosistemul I. Se reface astfel starea reducătoare a acestui sistem. Refacerea stării reduse a fotosistemului II se realizează prin eliberarea O_2 din apă. Aceste reacţii pot fi redate astfel:

$$H_2O + NADP^+ + 2P_a + 2ADP \xrightarrow{h\nu} 1/2O_2 + NADPH + H^+ + 2ATP + 2H_2O$$

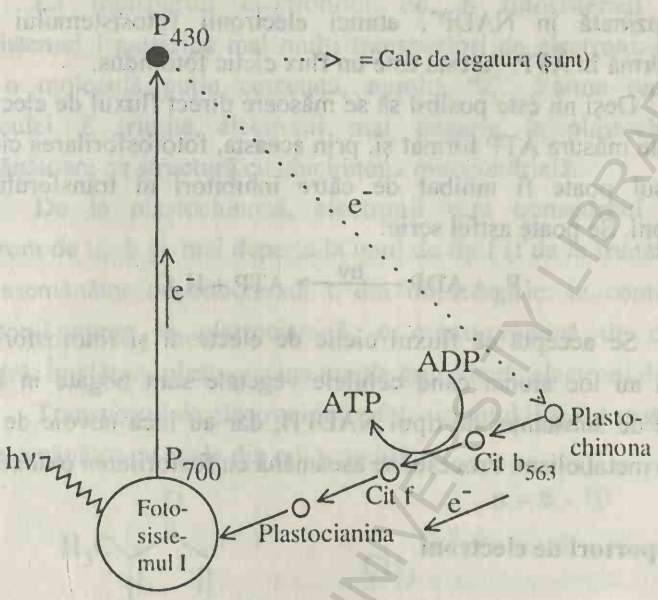


Fig. 8.5. Transport de electroni fotoindus, ciclic, la care este cuplata fosforilarea

Molecula de H_2O din stânga funcționează ca donor de electroni. Cele două molecule din membrul drept provin din ADP și fosfat.

Fluxul ciclic de electroni și fotofosforilarea ciclică

Acest flux ciclic de electroni a fost pus în evidență prin fosforilarea ADP la ATP, în absența acceptorilor de electroni. Pentru fosforilarea ADP este necesară energia luminoasă. Dacă această energie este

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

înmagazinată în $NADP^+$, atunci electronii fotosistemului I se transformă în ATP. Acesta este un flux ciclic fotoindus.

Deşi nu este posibil să se măsoare direct fluxul de electroni, se poate măsura ATP format şi, prin aceasta, fotofosforilarea ciclică. Procesul poate fi inhibat de către inhibitori ai transferului de electroni. Se poate astfel scrie:

$$P_a + ADP \xrightarrow{h\nu} ATP + H_2O$$

Se acceptă că fluxul ciclic de electroni şi fotofosforilarea ciclică au loc atunci când celulele vegetale sunt bogate în forme reduse de substanţe, de tipul NADPH, dar au încă nevoie de ATP pentru metabolism. Procesul se aseamănă cu fosforilarea oxidativă.

Transportori de electroni

La transportul electronilor de la fotosistemul I la $NADP^+$ iau parte cel puţin trei purtători de electroni. Primul este colorantul numit P_{700} care posedă o bandă de absorbţie la 700 nm.

Cel de-al doilea transportor este feredoxina, o proteină neheminică, asemănătoare cu proteina neheminică din mitocondrii. Feredoxina din spanac are M ≈ 10 700. Conţine 2 atomi de fier, legaţi specific de 2 atomi de sulf. Prin acidularea feredoxinei se eliberează H_2S. Feredoxina se poate reduce printr-o reacţie unielectronică şi se reoxidează din nou. Feredoxina nu poate reduce direct $NADP^+$. Fără acţiunea unei flavoproteine, *Feredoxin-NADP-Oxidoreductaza*, care a putut fi izolată din cloroplastele de spanac.

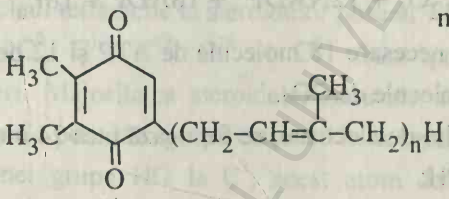
$$2Fd_{red} + 2H^+ + NADP_{ox} \xrightarrow{Oxidoreductaza} 2Fd_{ox} + NADPH + H^+$$

Prin Fd a fost simbolizată feredoxina.

La transportul electronilor de la fotosistemul II la fotosistemul I participă mai mulți transportori de electroni. Primul este o moleculă puțin cercetată, numită "Z". Forma redusă a moleculei Z trimite electronii mai departe la plastochinonă, asemănătoare ca structură cu ubichinona mitocondrială.

De la plastochinonă, electronii sunt transportați la un citocrom de tip b și, mai departe la unul de tip f (f de la frunză) care este asemănător cu citocromul c din mitocondrie. În continuare, electronii ajung la plastocianină, o cupru-proteină de culoare albastră. În sfârșit, plastocianina umple golurile de electroni din P_{700}.

Transportul de electroni între fotosistemul II și fotosistemul I este asemănător cu acela din mitocondrii.



Plastochinona

Bilanțul energetic al fotosintezei

Variația energiei libere standard la sinteza unei hexoze din CO_2 și H_2O este:

$$6CO_2 + 6H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad \Delta G^0 = +2872 \text{ kJ}$$

Energia unei cuante luminoase depinde de lungimea de undă. Ea este de 293 kJ / einstein la 400 nm și 176 kJ / einstein la 700 nm. Din cauza participării lui P_{700} la fotosinteză, care absoarbe la 700 nm, se consideră pentru bilanțul energetic, valoarea de 176 kJ / einstein.

Numărul de cuante de lumină folosite experimental este proporțional cu cantitatea de CO_2 redus. Trebuie aflat numărul de cuante necesare unei molecule de hexoză. S-au calculat 48 cuante pe molecula de hexoză, sau 8 cuante pentru fiecare moleculă de O_2 format. Aşadar, pentru o moleculă de hexoză sunt necesare 48 cuante, adică $E = 48 \cdot 176\ kJ \cdot einstein^{-1} = 8450\ kJ$. Se poate calcula apoi randamentul termodinamic: 2872 kJ/8450Kj = 34%. Acesta este apropiat de cel al arderii glucozei şi fosforilării oxidative.

Dacă se consideră cea de-a doua fază, a reducerii CO_2 la întuneric, se poate scrie ecuația:

$$6CO_2 + 12NADPH + 12H^+ + 18ATP + 12\ H_2O \longrightarrow$$

$$\longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 12NADP^+ + 18ADP + 18P_a$$

Sunt aşadar necesare 18 molecule de ATP şi 12 de NADPH pentru a reduce 6 molecule de CO_2.

În timpul transportului de electroni, se formează însă 24 molecule de ATP şi 12 de NADPH:

$$48h\nu + 12H_2O + 12NADP^+ + 24\ P_a + 24ADP \longrightarrow$$

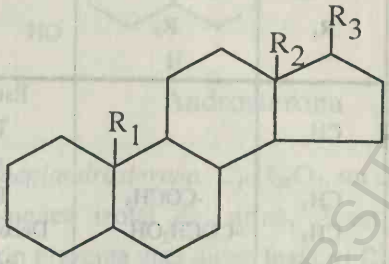
$$\longrightarrow 6O_2 + 12NADPH + 12H^+ + 24ATP + 12H_2O$$

Se formează o cantitate mai mare de ATP decât este necesar reducerii CO_2 în faza de întuneric.

Un lan de porumb fixează cu puțin peste 2% din energia luminoasă primită de la Soare, în timp ce trestia de zahăr se apropie de 8%.

CAP. X. STEROIDE

Steroidele reprezintă substanțe ce posedă scheletul de carbon tetraciclic al 1,2-ciclopenteno-perhidrofenantrenului.



Nucleul tetraciclic al steroidelor posedă 7 centre de asimetrie la C^5, C^8, C^9, C^{10}, C^{13}, C^{14} și C^{17}. Sunt posibili astfel 128 stereoizomeri. Majoritatea steroidelor naturale au o grupă OH în poziția 3 (unele posedă o grupă cetonică în această poziție). Datorită prezenței unei grupe HO la C^3, acest atom devine asimetric iar numărul stereoizomerilor se dublează.

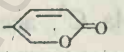
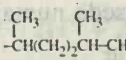
Fiecare steroidă posedă numai o anumită configurație, bine definită, dintre multe posibile.

Hormoni sexuali

Hormonii produși de glandele sexuale (gonade) și deversați de acestea, în concentrații mici, în sânge, determină dezvoltarea organelor sexuale la pubertate și funcționarea lor normală mai târziu.

Hormonii feminini sunt de două feluri: *hormonul estrogen* (estradiolul) și *hormonul gestogen* (progesterona); *hormonul androgen* este de un singur tip (*testosterona*). Toți trei sunt hormoni primari produși de gonade. Prin transformarea lor metabolică, apar

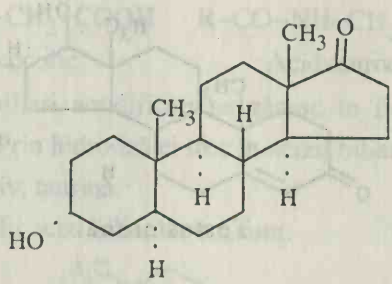
derivați cu structură puțin modificată (estronă și estriol din estradiol; androsteronă și dehidroepiandrosteronă din testosteronă). Aceștia au o activitate hormonală mai slabă decât hormonii primari.

Nr at. C	Tipul	R_1	R_3	Exemple
18	Estrogeni	-	-	Estradiol, estronă
19	Androgeni	CH_3	-	Testosteronă, androsteronă
21	Gestogeni	CH_3	$-COCH_3$	Progesteronă
21	Hormoni corticosteroizi	CH_3	$-COCH_2OH$	Dezoxicorticosteronă, corticosteronă, cortizonă
23	Agliconi cardiotonici	CH_3, CHO, CH_2OH		Digitoxigenină, strofantidină
24	Otravuri de broască râioasa	CH_3		Bufalină, bufotalină
27	Zoosteroli	CH_3		Colesterol, coprostanol

Producția hormonilor sexuali în gonade este dirijată de hormonii gonadotropi (cu structură proteică) secretați la rândul lor de lobul anterior al hipofizei.

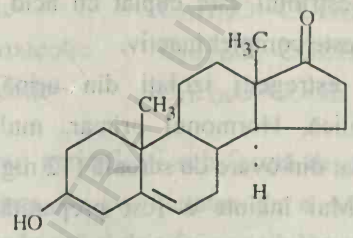
Hormoni androgeni

Androsterona $C_{19}H_{30}O_2$ a fost izolată prima oară din urină (15 mg din 15000 l urină). Se comportă ca o hidroxicetonă și formula sa a fost confirmată prin sinteză parțială.



Androsterona

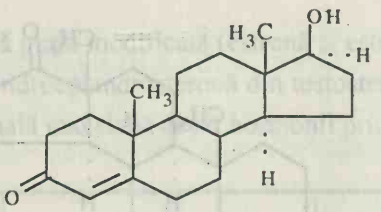
Dehidroepiandrosterona, $C_{19}H_{28}O_2$, un alt hormon androgen a fost de asemenea izolat din urină. Acest compus diferă de androsteronă prin prezența unei duble legături C^5-C^6 și configurația β a grupei HO de la C^3. Activitatea androgenă este de două ori mai slabă decât a androsteronei.



Dehidroepiandrosterona

Testosterona, $C_{19}H_{28}O_2$ a fost izolată din extractul testicular. Acesta își pierde complet activitatea androgenă când este încălzit cu alcalii, în timp ce hormonii androgeni izolați din urină nu sunt modificați de alcalii.

Structura sa a fost stabilită pe baza relațiilor ei cu dehidroepiandrosterona.



Testosterona

Hormoni estrogeni

Din urina femeilor gravide s-a izolat *estrona* cristalizată. Un hormon asemănător, dar cu efect mai slab, *estriolul,* a fost izolat tot din urina de om. Din urina de iapă gestantă au fost izolaţi alţi hormoni estrogeni, mai puţin activi, *equilenina* şi *equilina.* Au puncte de topire nete şi sunt optic active.

Estrona se găseşte în urină, în cea mai mare parte esterificată cu acid sulfuric; estriolul este cuplat cu acid glucoronic. Acidul estriol-glucuronic este complet inactiv.

Hormonii estrogeni izolaţi din urină sunt produşi de degradare metabolică. Hormonul primar, mult mai activ decât estrona, a fost izolat din ovare de scroafă (12 mg din 4 t de ovare) şi numit *estradiol.* Mai înainte a fost preparată din estronă, prin hidrogenare catalitică.

Acizii biliari

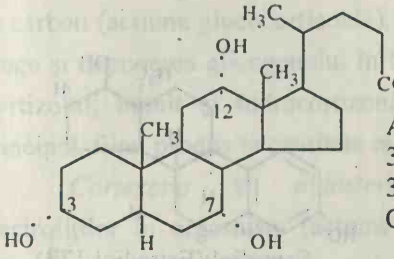
Fierea de ficat conţine acizi cu structură steroidă, combinaţi ca amide cu glicocol şi cu taurină şi denumiţi, de aceea, *acizi biliari conjugaţi* sau amidificaţi. Cel mai important acid biliar, *acidul colic* este conjugat cu glicocolul cu formare de *acid glicocolic,* iar combinaţia corespunzătoare cu taurina se numeşte *acid taurocolic.*

$R-CO-NH-CH_2-COOH$ $R-CO-NH-CH_2-CH_2-SO_3H$

Acid glicocolic Acid taurocolic

Acizii biliari amidificați se găsesc în fiere sub formă de săruri de sodiu. Prin hidroliză ei trec în acizii biliari propriu-zişi şi în glicocol, respectiv, taurină.

Principalii acizi biliari la om sunt:



Acid 3,7,12 - trihidroxicolanic
3,12 = dezoxicolic
3 = litocolic
Colanic = fara HO

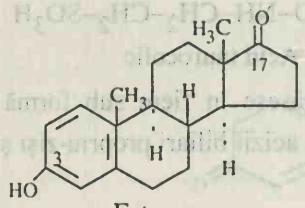
Acid colic

acidul colic	$C_{23}H_{39}O_3-COOH$
acidul dezoxicolic	$C_{23}H_{39}O_2-COOH$
acidul litocolic	$C_{23}H_{39}O-COOH$

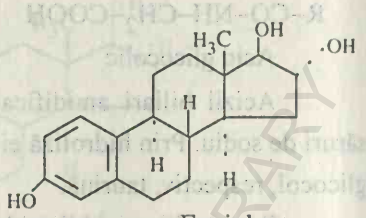
Acizii biliari amidificați sub formă de săruri de sodiu, aşa cum se află în fiere, au proprietatea de a solubiliza numeroase substanțe insolubile în apă şi de a face posibilă astfel trecerea lor prin mucoasa intestinală. Solubilizează astfel gliceride şi acizi graşi, β-carotina şi vitamina K.

Hormoni corticosteroizi

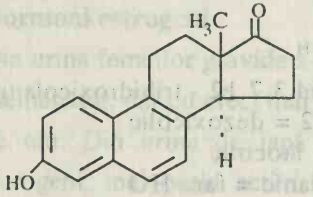
Glandele suprarenale posedă 2 regiuni cu funcție distinctă: măduva, care secretă adrenalină şi scoarța sau cortexul care secretă un amestec de hormoni steroizi indispensabili vieții.



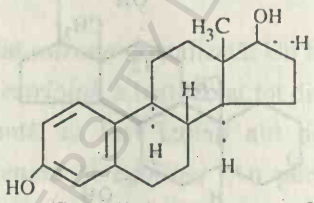
Estrona



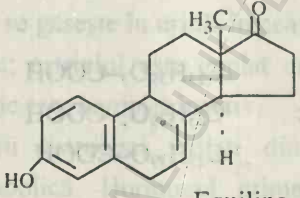
Estriol



Equilenina



Estradiol (Estradiol 17β)



Equilina

Îndepărtarea glandelor suprarenale determină moartea animalului de experiență în câteva zile. Insuficiența acestor hormoni conduce la modificări în metabolismul hidraților de carbon și la tulburări în bilanțul electroliților și al apei în întregul organism. Se mai observă creșterea ureei în sânge, slăbiciune musculară și pigmentarea pielii în părțile expuse luminii.

Prin injectarea de extracte adrenocorticale, animalele lipsite de capsulele suprarenale pot fi menținute în viață un timp indefinit.

BCU CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Producția de hormoni corticosteroizi este stimulată de hormonul corticotrop (ACTH), secretat de lobul anterior al hipofizei.

S-au separat 29 substanțe cristalizate cu structură steroidă. Dintre acestea, numai 7 au proprietatea de a menține în viață animalele cu glandele suprarenale extirpate.

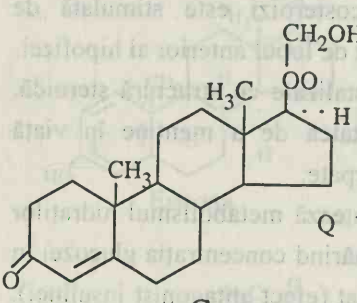
Cortizolul și *cortizona* influențează metabolismul hidraților de carbon (acțiune glucocorticoidă), mărind concentrația glucozei în sânge și depunerea glicogenului în ficat (efect antagonist insulinei). Cortizolul, numit și hidrocortizonă este hormonul corticosteroid principal, fiind produs în cantitate mai mare decât ceilalți.

Cortexona și *aldosterona* reglementează bilanțul electroliților în orgasnism (acțiune mineralocorticoidă) favorizând reținerea ionilor Na^+ și Cl^- și a apei și eliminarea ionilor K^+.

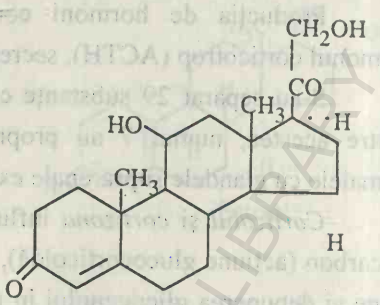
Cortizona, cortizolul și unii derivați ai lor posedă o remarcabilă acțiune antiinflamatoare și antialergică dovedindu-se medicamente eficace în combaterea artritei reumatice și a altor afecțiuni.

Aldosterona, al 7-lea hormon steroid, are o structură analoagă cu a corticosteronei dar C_{13} nu este CH_3 ci CHO.

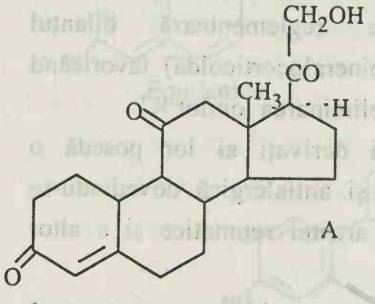
BCU IAȘI / CENTRUL DE CĂRȚI RARE



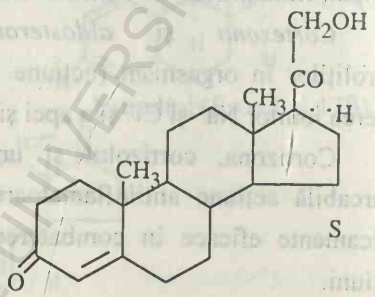
Cortexona
(Dezoxicorticosterona)



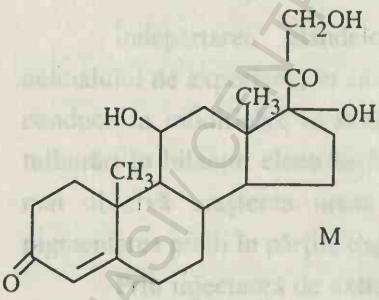
Corticosterona



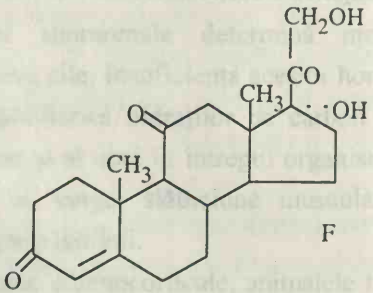
11 Dehidrocorticosterona



Cortexolona



Cortizol



Cortizona

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie selectivă

I. F. Dumitru – *Biochimie*, Edit. did. ped., Bucureşti, 1980.

Nastasia Gheorghiță, Anica Iacobovici, Luminița Jerca, Irina Popovici – *Biochimie medicală.* Curs Univ. med. farm. "Gr. T. Popa, Iaşi, 1996.

G. Zubay – *Biochemistry*, Addison-Wesley Publ. Comp., Massachusets, California, London, Amsterdam, Ontario, Sydney, 1983.

C. D. Nenițescu – *Chimie organică*, vol. I şi II, Edit. tehnică, Bucureşti, 1980.

D. C. Cojocaru – *Enzimologie*. Edit. Gama, Iaşi, 1997.

D. C. Cojocaru – *Biochimia vitaminelor*. Edit. Gama, Iaşi, 1996.

D. C. Cojocaru, D. I. Cojocaru – *Biochimia hormonilor*. Edit. Corson, Iaşi, 1999.

V. Artenie – *Biochimie*. Edit. Univ. "Al. I. Cuza" Iaşi, 1991.

A. Lehninger – *Biochimie*. Vol. I şi II. Ed. tehnică, Bucureşti, 1987 şi 1992.

A. Mazur, B. Harrow – *Textbook of Biochemistry*. Ed. W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1971.

M. E. Rafelson – *Basic Biochemistry*. Ed. MacMillan, New York, London, 1965.

W. B. Wood, J. H. Wilson, R. M. Benbow, L. E. Hood – *Biochemistry: a problems approach*. Ed. W. A. Benjamin, London, 1974.

K. Dose – *Biochemie, eine Einführung*. Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1991.

G. Hobon – *Biochemie*. Ed. Herder, Freiburg, Basel, Wien, 1977.

O. Müller – *Grunglagen der Biochemie*. Vol. II. Ed. Georg Thieme, Stuttgart, 1977.

I. Stryer – *Biochemie*. Vol. I şi II. Ed. Friedrich Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1977 şi 1978.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

T. M. Devlin - *Textbook of Biochemistry*. 2nd ed. Ed. John Wiley, New York, Chichester, Brisbane, 1986.

H. Forster, L. Lacko – *Physiologische Chemie*. Ed. Enke Verlag, Stuttgart, 1975.

E. J. Bigwood – *Protein and amino acid functions*. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, 1972.

D. K. Lavalee – *The chemistry and biochemistry of N-substituted porphyrins*. Academic Press, New York, 1987.

E. Macovschi – *Biostructura*. Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.

J. B. Harborne – *Introduction to ecological Biochemistry*. Academic Press, London, San Diego, New York, 1988.

D. H. Northcote – *Plant Biochemistry*. University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 1977.

E. Buddecke – *Grundriss der Biochemie*. Ed. Walter de Gruyter, Berlin, 1977.

V. Dinu, E. Trutia, E. Popa-Cristea, A. Popescu – *Biochimie medicală*. Ed. medicală, Bucureşti, 1996.

x x x – *Annual reports in Medicinal Chemistry*. Acad. Press, New York, London, 1968 – 1994.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

G. Drochioiu, I. Mangalagiu, I. Druță

BIOCHIMIE GENERALĂ

Summary

The goal in preparing this book of general biochemistry was to help the students in chemistry as well as the chemists to understand the basic problems of biochemistry. It could be of any help for they who intend to make the first steps in the field of life science having some knowledge of organic chemistry. Although the biochemistry is conceived as a science of the chemical transformations in the livings, the physicochemical properties of the vitamins, sugars, proteins, amino acids, fats and fatty acids etc are also discussed. The water-soluble vitamins are thus described in the first chapter of ten. The second chapter deals with the structure and physiological functions of liposoluble vitamins. The basic problems of the enzymes are treated in brief in the third chapter of this book. Also, selected aspects of the structure and metabolism of sugars and carbohydrates, peptides, proteins, amino acids, and fatty acids are presented in the next chapters. Some aspects of the structure and mechanism of action of peptide and steroid hormones are mentioned in a few words only. The style is as simple as possible in order to

BCU "AL. I. CUZA" UNIVERSITY LIBRARY

explain the basic processes which the biochemistry deals with. Nevertheless, the authors tried to suggest that the chemical processes in the living organisms be subordinated to the biological ones. Also, we believe that the biological phenomena are developing and are based on the chemical processes and substances and they are not obligatory a product of them. In other terms, the biological laws are determinant in the living world, not the chemical ones. In addition, the book is intended as an invitation for the chemists and the students to admire and to understand other kind of thinking on the chemical transformation: those within the life.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Introducere 3

Cap. I. VITAMINE **5**

Vitamine hidrosolubile 7

Acidul lipoic 17

Vitamina B_2 19

Vitamina B_3 28

Vitamina B_4 (colina) 32

Vitamina B_5 34

Vitamina B_6 41

Vitamina B_7 49

Vitamina B_9 55

Vitamina B_{12} 60

Vitamina C 68

Cap. II. VITAMINE LIPOSOLUBILE **75**

Vitamina A 76

Vitamina D 86

Vitamina E 91

Vitaminele K 97

Ubichinone 103

Acizi graşi esenţiali 105

Cap. III. ENZIME **107**

Nomenclatura şi clasificarea enzimelor 110

Structura enzimelor 116

Cinetica reacţiilor enzimatice 120

Centrul catalitic al enzimei 120

Viteza reacţiei enzimatice 123

Influenţa concentraţiei enzimei 126

Influenţa concentraţiei substratului 127

Influenţa temperaturii 129

Enzime alosterice 130

Cap. IV. GLUCIDE **133**

Clasificare 133

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Izomerie 134
Structura ciclică 135
Transformări biochimice ale monozaharidelor 137
Fermentația alcoolică 138
Glicoliza 146
Degradarea oxidativă a hidraților de carbon 148
Ciclul acidului citric 151
Fotosinteza hidraților de carbon în plante 153
Clorofila 154
Bilanțul energetic al fotosintezei 157
Biosinteza zaharurilor 160
Reglarea formării glucozo-6-fosfatului 164
Gluconeogeneza din aminoacizi 164
Gluconeogeneza din acetil CoA 166
Sinteza glicogenului și a amidonului 167
Transformarea glucozo-6-fosfatului în hexoze 170
Cap. V. METABOLISMUL ACIZILOR GRAȘI ȘI AL PROSTAGLANDINELOR 171
Biosinteza acizilor grași 171
Biosinteza acizilor grași nesaturați 179
Biosinteza acizilor grași cu catenă ramificată 181
Degradarea acizilor grași liberi 181
Degradarea acizilor grași prin β-oxidare 183
Ciclul Krebs și β–oxidarea acizilor grași 187
Degradarea acizilor grași cu număr impar de atomi de carbon 187
Geneza acetoacetatului, cetoza și echilibrul acido–bazic 188
Metabolismul și acțiunea biologică a prostaglandinelor 190
Cap. VI. METABOLISMUL AMINOACIZILOR 193
Decarboxilarea aminoacizilor 195
Transaminarea aminoacizilor 197
Metabolismul alaninei 198
Biosinteza nucleului porfirinic 202

Ciclul ureogenetic 202
Formarea creatinei 203
Biosinteza aminoacizilor 205
Biosinteze în familia acidului glutamic 212
Cap. VII. PEPTIDE BIOLOGICE 215
Proprietăţile peptidelor 216
Dipeptide 216
Tripeptide 217
Hormoni peptidici 218
Biochimia acţiunii hormonilor 220
Rolul adrenalinei 223
Glucagonul 226
Insulina 227
Peptide cu acţiune antibacteriană 228
CAP. VIII. METABOLISMUL PROTEINELOR 231
Reacţia de activare 232
Rolul de adaptor al ARN_t 235
Iniţierea lanţului polipeptidic 236
Ciclul de elongaţie 237
Terminarea lanţului polipeptidic 238
Prelucrarea post-translaţională 239
Inhibitori ai sintezei proteice 239
Necesarul energetic al sintezei proteice 240
Digestia şi absorbţia proteinelor 241
Cap. IX. FOTOSINTEZA 243
Sistemul fotosintetic intracelular 245
Obţinerea moleculelor în stare excitată 245
Pigmenţii implicaţi în fotosinteză 246
Clorofila 246
Pigmenţi auxiliari 248
Reacţia Hill 249
Fluxul electronic şi fosforilarea 251
Fotoreacţii în fotosinteză 251
Legătura dintre cele două fotosisteme 252
Fluxul electroni şi fotofosforilarea 253

Transportori de electroni 254
Bilanțul energetic al fotosintezei 255
Cap. X. STEROIDE **257**
Hormoni sexuali 257
Hormoni androgeni 258
Hormoni estrogeni 260
Acizii biliari 260
Hormoni corticosteroizi 261
BIBLIOGRAFIE **265**
Summary 267
Cuprins 269
Content 273

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Content

Introduction 3

Cap. I. VITAMINS **5**

Water-soluble vitamins 7
Lipoic acid 17
Vitamin B_2 19
Vitamin B_3 28
Vitamin B_4 32
Vitamin B_5 34
Vitamin B_6 41
Vitamin B_7 49
Vitamin B_9 55
Vitamin B_{12} 60
Vitamin C 68

Cap. II. LIPOSOLUBLE VITAMINS **75**

Vitamin A 76
Vitamin D 86
Vitamin E 91
Vitamins K 97
Ubiquinones 103
Essential fatty acids 105

Cap. III. ENZYMES **107**

Generals. Denomination 110
The structure of enzymes 116
Kinetics of the enzymatic reactions 120
Catalytic center of the enzyme 120
The rate of the enzymatic reaction 123
Influence of the enzyme concentration 126
Influence of the substrate concentration 127
Influence of the temperature 129
Allosteric enzymes 130

Cap. IV. SUGARS **133**

Classification 133

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Isomery 134
The cyclic structure 135
Biochemical transformation of the monosacharides 137
Alcoholic fermentation 138
Glycolysis 146
Oxidative degradation of sugars 148
Citric acid cycle 151
Photosynthesis of the sugars in plants 153
Chlorophyll 154
Energetics of the photosynthesis 157
Sugar biosynthesis 160
Glucose-6-phosphate formation 164
Gluconeogenesis from amino acids 164
Gluconeogenesis from acetyl-CoA 166
Glycogen and starch synthesis 167
Transformation of glucose-6-phosphate into hexozes 170
Cap. V. METABOLISM OF FATTY ACIDS AND PROSTAGLANDINS 171
Biosynthesis of fatty acids 171
Biosynthesis of unsaturated fatty acids 179
Biosynthesis of branched chain fatty acids 181
Degradation of free fatty acids 181
Degradation of free fatty acids by β-oxidation 183
Krebs cycle and β-oxidation of fatty acids 187
Degradation of fatty acids with an odd number of carbons 187
Acetoacetate genesis, ketose and acid-base equilibrium 188
Metabolism and biological action of the prostaglandin 190
Cap. VI. AMINO ACID METABOLISM 193
Decarboxylation of amino acids 195
Transamination of amino acids 197

Alanine metabolism 198
Biosynthesis of porphyrin core 202
Urea cycle 202
Formation of creatine 203
Biosynthesis of amino acids 205
Biosynthesis in the glutamate family 212
Cap. VII. BIOLOGICAL PEPTIDES 215
The properties of peptides 216
Dipeptides 216
Tripeptides 217
Peptide hormones 218
Biochemistry of hormone action 220
The role of adrenaline 223
Glucagon 226
Insulin 227
Peptides with bactericide activity 228
CAP. VIII. METABOLISM OF PROTEINS 231
Activation reaction 232
Role of tRNA 235
The initiation of protein synthesis 236
The elongation cycle 237
Termination of protein synthesis 238
Posttranslational modification of proteins 239
Inhibitors of protein synthesis 239
Energy requirement in protein synthesis 240
Digestion and absorption of proteins 241
Cap. IX. PHOTOSYNTHESIS 243
Intracellular photosynthetic system 245
High energy molecules 245
Pigments involved in photosynthesis 246
Chlorophyll 246
Accessory pigments 248
Hill Reaction 249
Electron-transfer and phosphorylation 251
Photoreactions in photosynthesis 251

BCU IASE ... UNIVERSITY LIBRARY

Coupling between the two photo-systems 252
Electron transfer and photophosphorylation 253
Electron-Transport 254
Energy requirement of photosynthesis 255
Cap. X. STEROIDS **257**
Sexual hormones 257
Androgenous hormones 258
Oestrogen hormones 260
Bile acids 260
Corticosteroide hormones 261
LITERATURE **265**
Summary 267
Content (roum) 269
Content (engl) 273

Tipărit la S.C. INTER OFEN - Iaşi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lucrare editată în cadrul proiectului CNCSIS cod 109, cu sprijinul financiar al Guvernului României și al Băncii Mondiale.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN: 973-8076-12-6